

10/522716

DT15 PCT/PTO 28 JAN 2005

DOCKET NO.: 265233US0X PCT

#2

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Akito TANAKA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

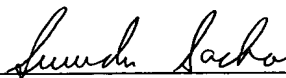
FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP03/09640

INTERNATIONAL FILING DATE: July 30, 2003

FOR: METHOD OF INHIBITING NONSPECIFIC INTERACTION BETWEEN MOLECULES ON
SOLID PHASE SUPPORT**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:**COUNTRY**
Japan**APPLICATION NO**
2002-222226**DAY/MONTH/YEAR**
30 July 2002Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the
International Bureau in PCT Application No. PCT/JP03/09640. Receipt of the certified
copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been
acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

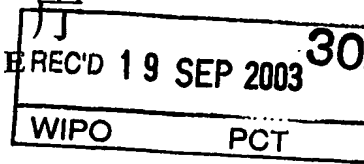
22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

10/522716
Rec'd PCT/PTO 28 JAN 2005
PCT/JP 03/09640

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE



30.07.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 7月30日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-222226
[ST. 10/C]: [JP2002-222226]

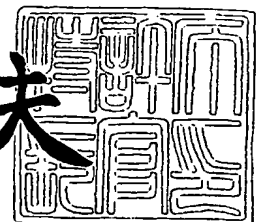
出 願 人
Applicant(s): 株式会社リバース・プロテオミクス研究所
藤沢薬品工業株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月 4日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特2003-3072140

【書類名】 特許願
【整理番号】 A5440
【提出日】 平成14年 7月30日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 G01N 33/00
G01N 33/15
G01N 33/50

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバー
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 田中 明人

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバー
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 寺田 知弘

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバー
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 田村 鶴紀

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバー
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 市山 高明

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバー
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 山崎 晃

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバース
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 古屋 実

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県木更津市矢那 1 5 3 2 番地 3 株式会社リバース
・プロテオミクス研究所内

【氏名】 原村 昌幸

【特許出願人】

【識別番号】 501260082

【氏名又は名称】 株式会社リバース・プロテオミクス研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000005245

【氏名又は名称】 藤沢薬品工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100080791

【弁理士】

【氏名又は名称】 高島 一

【電話番号】 06-6227-1156

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 006965

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9715693

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 固相担体上における分子間の非特異相互作用の抑制方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 固相担体における固相表面の疎水的性質を調節することを特徴とする、分子の固相表面への非特異的吸着を調節する方法。

【請求項 2】 分子 A を固相担体に固定化し、当該固相上での分子 A と該分子 A と特異的に相互作用する分子 B との間での特異相互作用を解析する過程において、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、非特異相互作用を抑制する方法。

【請求項 3】 分子 A を固相担体に固定化し、当該固相上での分子 A と該分子 A と特異的に相互作用する分子 B との間での特異相互作用を用いて分子 B を選別する過程において、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、非特異相互作用を抑制する方法。

【請求項 4】 分子 A および分子 B の組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである請求項 2 または 3 記載の方法。

【請求項 5】 分子 A および分子 B の組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である請求項 2 または 3 記載の方法。

【請求項 6】 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理が、分子 A の固相担体への固定化の際に親水性スパーサーを導入することである、請求項 2 または 3 記載の方法。

【請求項 7】 親水性スパーサーが、固相担体および分子 A と結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、請求項 6 記載の方法：

- (1) 水素結合アクセプター数が 6 以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が 5 以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が 9 以上である。

【請求項 8】 さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項 7 記載の方法。

【請求項 9】 分子 A を固相担体に固定化し、当該固相上での分子 A と該分子 A と特異的に相互作用する分子 B との間での特異相互作用を解析する方法であって、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより非特異相互作用を抑制することを特徴とする方法。

【請求項 10】 分子 A を固相担体に固定化し、当該固相上での分子 A と該分子 A と特異的に相互作用する分子 B との間での特異相互作用を用いて、分子 B を選別する方法であって、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより非特異相互作用を抑制することを特徴とする方法。

【請求項 11】 分子 A および分子 B の組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】 分子 A および分子 B の組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 13】 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理が、分子 A の固相担体への固定化の際に親水性スパーサーを導入することである、請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 14】 親水性スパーサーが、固相担体および分子 A と結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、請求項 13 記載の方法：

- (1) 水素結合アクセプター数が 6 以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が 5 以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が 9 以上である。

【請求項 15】 さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項 14 記載の方法。

【請求項 16】 分子 A と特異相互作用を有する分子 B のスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

- (1) 分子 A を固相担体に親水性スパーサーを介して固定化する工程、
- (2) 分子 B を含むかまたは含まない試料を上記 (1) で得られた分子 A が固定

化された固相担体に接触させる工程、および

(3) 分子Aに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

【請求項17】 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである請求項16記載の方法。

【請求項18】 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である請求項16記載の方法。

【請求項19】 親水性スペーサーが、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、請求項16記載の方法：

- (1) 水素結合アクセプター数が6以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が5以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

【請求項20】 さらに、該親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項19記載の方法。

【請求項21】 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる為の親水性スペーサーであって、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである親水性スペーサー：

- (1) 水素結合アクセプター数が6以上である、
- (2) 水素結合ドナー数が5以上である、
- (3) 水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

【請求項22】 さらに、該親水性スペーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、請求項21記載の親水性スペーサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、固相担体を用いた分子間相互作用における基盤技術に関する。より詳しくは、解析を目的とする分子を固相担体に固定化し、当該固相上での分子間相互作用を活用し、当該相互作用を測定、解析することによって、解析を目的とする分子に特異的な相互作用を有する分子（以下、ターゲット分子ともいう）を選別、精製する、あるいは分子間の特異的な相互作用を解析する技術に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、分子間相互作用を基盤とした手法を用い、ある特定の分子に特異的な相互作用を有する分子を探索する試み、あるいは分子間相互作用を詳細に検討する研究が盛んに行われている。これは具体的には、低分子-低分子、低分子-高分子、あるいは高分子-高分子の組み合わせのうちの片方の分子を固相担体に固定し、両分子間の相互作用を測定する研究、あるいはそれに基づいて目的とするターゲット（固相担体に固定化した分子に特異相互作用を有する分子）を精製する研究に代表される。分子間相互作用を基盤とした各種手法の例としては、後者の例としての1) アフィニティー樹脂を用いたターゲット研究、前者の例としての2) 表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance: SPR)を応用した方法が有名である。1) の例としては、1989年のシュライバー教授によるアフィニティー樹脂を用いた免疫抑制剤FK506の結合タンパク質FKBP (FK506 binding proteins)の発見 (FK506の細胞内結合タンパク質としてのFKBP12の発見、Nature, 341, 758, 1989)、および引き続き行われたFK506-FKBP複合体によるFK506薬効メカニズムにおけるカルシニューリン阻害作用の発見 (Cell, 66, 807-815, 1991) や、抗癌剤Trapoxinのターゲットタンパク質としてのHDAC (Science, 272, 408, 1996) 発見等が有名である。また2) の例としては、固相担体として金薄膜を利用し、化合物あるいはタンパク質等とそれと特異的に相互作用するタンパク質等との相互作用を詳細に検討できるBIAcore (商品名) が有名である。

【0003】

しかし、これまでに上記手法において、特異的な分子間相互作用に基づく選別、精製の障害となる非特異的な分子間相互作用の存在が問題となってきた。これ

らは、重要な基盤技術である固相担体、詳しくは固相担体の表面の性状が原因と経験上考えられてきたが、どのような性状が非特異的な相互作用の要因となっているのか、また当該非特異分子間相互作用を効率的に抑制する方法は明確に知られていないのが現状である。例えばTentaGel (Fluka社、Cat. No=86364) 等一部の樹脂はPEGスパーサーを有する化学的・物理的に安定でかつアフィニティークロマト用樹脂としても使用されているが(例; Thorpe DS, Walle S., Combinatorial chemistry defines general properties of linkers for the optimal display of peptide ligands for binding soluble protein targets to TentaGel microscopic beads., Biochem Biophys Res Commun 2000 Mar 16;269(2):591-5)、非特異的な相互作用の抑制にどのような構造がどのように寄与しているのか等の基礎的な技術は知られないでいるし、その非特異的な相互作用がどの程度抑制されているかあるいはアフィニティー樹脂として十分機能しているのかについての情報も充分でないのが現状である。また、親水的な性質を有する糖誘導体から構成される樹脂(例えば、アフィゲル(Affigel; Bio-Rad社、Cat. No=153-2401) やセファロース誘導体(ファルマシア社、ECH Sepharose 4B、Cat. No=17-0571-01) 等が知られている)は、非特異的な分子間相互作用は小さいものの、糖誘導体であるため物理的・化学的に不安定となるその使用は制限されるものであった。

【0004】

上記分子間相互作用を基盤とした手法において、非特異的な相互作用を人為的に抑制することが可能となればこれらの手法の適応は一段と増すと考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、固相担体上での分子間相互作用解析において障害となる非特異的な相互作用を排除、抑制する方法の提供を目的とし、さらに当該方法を利用して、固相担体上に固定化された分子と特異的な相互作用(特異相互作用と同義)を有する分子を精製・解析する方法を提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、一定の低分子化合物を固相担体における固相表面に固定し、固定化したリガンドと特異的に相互作用する分子（ターゲット分子）あるいは非特異的に相互作用する分子を定量的に観測する研究を行い、固定化する化合物（リガンド）の疎水性パラメーターと非特異相互作用に相関性があること、すなわち固相表面の疎水的な性質が分子間の非特異的な相互作用（非特異相互作用と同義）を引き起こす要因となり得ることを見出した。さらにかかる知見をもとに、固相表面と検討対象分子であるリガンドとの結合に親水性のスペーサーを導入することにより非特異的な相互作用を抑制することに成功して本発明を完成するに至った。

【0007】

即ち本発明は下記の通りである。

- (1) 固相担体における固相表面の疎水的性質を調節することを特徴とする、分子の固相表面への非特異的吸着を調節する方法。
- (2) 分子Aを固相担体に固定化し、当該固相上での分子Aと該分子Aと特異的に相互作用する分子Bとの間での特異相互作用を解析する過程において、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、非特異相互作用を抑制する方法。
- (3) 分子Aを固相担体に固定化し、当該固相上での分子Aと該分子Aと特異的に相互作用する分子Bとの間での特異相互作用を用いて分子Bを選別する過程において、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことを特徴とする、非特異相互作用を抑制する方法。
- (4) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである上記(2)または(3)記載の方法。
- (5) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である上記(2)または(3)記載の方法。
- (6) 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理が、分子Aの固相担体への固定化の際に親水性スペーサーを導入することである、上記(2)ま

たは(3)記載の方法。

(7) 親水性スパーサーが、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、上記(6)記載の方法:

- ①水素結合アクセプター数が6以上である、
- ②水素結合ドナー数が5以上である、
- ③水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

(8) さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記(7)記載の方法。

(9) 分子Aを固相担体に固定化し、当該固相上での分子Aと該分子Aと特異的に相互作用する分子Bとの間での特異相互作用を解析する方法であって、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより非特異相互作用を抑制することを特徴とする方法。

(10) 分子Aを固相担体に固定化し、当該固相上での分子Aと該分子Aと特異的に相互作用する分子Bとの間での特異相互作用を用いて、分子Bを選別する方法であって、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を行うことにより非特異相互作用を抑制することを特徴とする方法。

(11) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである上記(9)または(10)記載の方法。

(12) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である上記(9)または(10)記載の方法。

(13) 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理が、分子Aの固相担体への固定化の際に親水性スパーサーを導入することである、上記(9)または(10)記載の方法。

(14) 親水性スパーサーが、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、上記(13)記載の方法:

- ①水素結合アクセプター数が6以上である、
- ②水素結合ドナー数が5以上である、

③水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

(15) さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記(14)記載の方法。

(16) 分子Aと特異相互作用を有する分子Bのスクリーニング方法であって、少なくとも以下の工程を含む方法：

- ①分子Aを固相担体に親水性スパーサーを介して固定化する工程、
- ②分子Bを含むかまたは含まない試料を上記①で得られた分子Aが固定化された固相担体に接触させる工程、および
- ③分子Aに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

(17) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および低分子化合物、低分子化合物および高分子化合物、ならびに高分子化合物および高分子化合物のいずれかである上記(16)記載の方法。

(18) 分子Aおよび分子Bの組み合わせが、低分子化合物および高分子化合物、または高分子化合物および高分子化合物である上記(16)記載の方法。

(19) 親水性スパーサーが、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである、上記(16)記載の方法：

- ①水素結合アクセプター数が6以上である、
- ②水素結合ドナー数が5以上である、
- ③水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

(20) さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になる官能基を有さないことを特徴とする、上記(19)記載の方法。

(21) 固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる為の親水性スパーサーであって、固相担体および分子Aと結合した状態で以下の特徴のいずれかを少なくとも有するものである親水性スパーサー：

- ①水素結合アクセプター数が6以上である、
- ②水素結合ドナー数が5以上である、
- ③水素結合アクセプター数および水素結合ドナー数の総計が9以上である。

(22) さらに、該親水性スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性に

なる官能基を有さないことを特徴とする、上記（21）記載の親水性スペーサー。

【0008】

本発明は、特異的な分子間相互作用を解析し、それを利用する技術（上記）において問題視されてきた、非特異的な分子間相互作用（例えばタンパク質の固相担体への非特異的な吸着に代表される）が、固相担体における固相表面とタンパク質等の分子との疎水相互作用によるものであるという知見に基づく。従って、本発明は固相担体における固相表面の疎水的性質を調節することによって、当該固相への種々の分子の非特異的な吸着を調節する方法を提供する。

【0009】

本明細書中、疎水的な性質は、一般的に疎水性パラメーターによって表すことができるが、例えば分配係数、具体的にはLOGPによって表すことができる。LOGPの算出には、簡便には、CLOGP（化合物の疎水性パラメーターを計算機によって見積もるソフトによって得られる予測値；例えばCorwin/Leo's program (CLOGP, Daylight Chemical Information System Co., Ltd)を使用して計算できる）等が利用されるが、疎水性のパラメーターはCLOGPに限定されるものではない。本発明では定性的に疎水性傾向が強まるにつれて、非特異的な相互作用が増加する。例えばCLOGPについて言えば、CLOGPが大きい程、疎水性が高いことを意味し、CLOGPの増加は非特異的な相互作用（例えば固相表面へのタンパク質の非特異的な吸着）の増加と相関関係にある。ここで疎水性パラメーターの変化は、例えば固相表面上に固定化する分子（分子A）を様々な値のものに変更することによって実施され得るし、また、固相担体と分子Aとの間に親水性のスペーサーを導入することによって、固相表面の疎水的な性質を緩和、低減化することもできる。一方、より疎水的な性質を有するスペーサーを導入すること等によって疎水性が増し、ひいては非特異的な相互作用が増加する。すなわち、本発明における疎水的性質の「調節」とはその増加ならびに低減化の両方を意図する。

【0010】

当該スペーサーの導入は、CLOGPが大きいことが予測されるリガンドを固

相に固定化する必要がある場合に好ましい態様であり、以下に非特異相互作用を抑制する手段として親水性スパーサーを用いた場合について詳述する。

【0011】

本発明は、固相担体に固定化された分子（本明細書中、分子Aとも定義し、便宜上リガンドとも称する）と当該分子に対して特異的な相互作用を有する分子（本明細書中、分子Bとも定義し、便宜上ターゲット分子とも称する）との相互作用を解析する技術、かかる解析をもとに分子Bを同定、選別するという技術を提供する。本明細書中、リガンドならびにターゲット分子という用語は、互いに特異的な分子間相互作用を有する組み合わせを意図するものであって、当該組み合わせのうち、片方をリガンドとして固相に固定化すれば他方がターゲット分子となり、すなわちどちらを固相に固定化するかによって、それらの呼称は変更され得る。分子Aに特異的な相互作用を有する分子Bは1種類とは限らず、また同様に分子Bに特異的な相互作用を有する分子Aも1種類とは限らない。本明細書では分子Aならびに分子Bという用語は、互いに異なる物質であることを明確にすべく、便宜上、AあるいはBとの符号を付したものである。ある特定の分子を指すものではなく特異的な相互作用を有する分子同士の各々を意図するものである。

【0012】

「特異的な相互作用」とは、特定のリガンド（特定のターゲット分子）のみを特異的に認識して結合するような特性を発揮する作用であり、アゴニストあるいはアンタゴニストに対する特異的受容体、基質に対する酵素、そして例えばFK 506（リガンド）に対するFK 506結合タンパク質（ターゲット分子）や、ステロイドホルモンに対するステロイドホルモン受容体（例；dexamethasonとglucocorticoid receptor）、抗がん剤trapoxinに対するHDAC等の関係が「特異的な相互作用」に該当する。一方、「非特異的な相互作用」とは、それによる結合の対象が広範にわたり且つ特定分子に限定されず、反応条件によって種々変化するような状況を生じる作用をいい、本発明においては、固相上の分子Aや固相担体表面に、結合・吸着するような不特定の分子間の作用を意味する。「非特異的な相互作用」は、「特異的な相互作用」に基づくりガンドとターゲット分子

の結合の障害となるか、あるいは混同されることにより「特異的な相互作用」による結合を見落としてしまう危険性がある。

【0013】

本発明において「特異相互作用を解析する」とは、分子Aと分子Bとの間の特異相互作用の程度を、相互作用情報として得ることであって、例えばK_d、K_a等の数値として得ることができる。本発明において「選別」とは、上記相互作用情報に基づき、分子Aと特異的な相互作用を有するか否かを判定し、分子Bを同定することを意図する。

【0014】

本発明の非特異相互作用を抑制する方法、分子Aと分子Bとの特異相互作用を解析する方法ならびに分子Bを選別する方法においては、固相担体における固相表面の疎水的性質を低減させる処理を必須とする。かかる処理としては、例えば、固相担体への分子Aの固定化の際に親水性スパーサーを導入する方法が挙げられる。親水性スパーサーを導入することにより固相担体表面の疎水的な性質が変化し、非特異的な相互作用を抑制することができる。このような固相担体と分子Aとの間に導入された親水性スパーサーという非特異的相互作用を抑制する手段を用いることによって、分子Aに特異的な相互作用を有する分子（ターゲット分子：分子B）を同定、選別することおよび両者の相互作用を正確に測定することが可能となる。

【0015】

本発明において用いられる固相担体は、その上で分子Aと分子Bの特異的な相互作用が生じるものであれば特に限定されず、当分野で通常使用されるものが利用でき、その後に実施する分子Bの同定、選別の工程の為に行われる方法に応じて適宜決定される。材質としては、例えば、樹脂（ポリスチレン、メタクリレート系樹脂、ポリアクリルアミド等）、ガラス、金属（金、銀、鉄、シリコン等）等が用いられる。これらの固相は、いかなる形状のものであってもよく、また上記した材質の種類や、その後に実施する分子Bとの相互作用の解析、分子Bの同定、選別の工程の為に行われる方法に応じて適宜決定される。例えば板状、ビーズ状、薄膜状、糸状、コイル状等が挙げられるが、樹脂からなるビーズであれば

カラムに充填することによりその後の操作を簡便にし、また金属の薄膜であれば表面プラズモン共鳴によるBIACORE等の担体として好適に使用できる。またガラスプレートを用いることも好適である。

【0016】

本発明において使用する固相は、上述の如く、その材質や形状に特に制限はないが、当然のことながら、分子Aが固定化されないような、あるいは分子Aが固定化されるものの分子Bとの特異的な相互作用を発揮することができないような構造上の障害を有するものは、余分な工程を経る必要があつて操作が煩雑になったり、あるいは使用に耐えなかつたりする場合があるので、本発明を実施する上で好ましくない。

【0017】

本発明において、「親水性スパーサー」とは、分子Aの固相担体への固定化の際に導入されて固相担体と分子Aとの間に介在する基となる物質であつて、親水性である。親水性の程度については後述する。ここで「介在する」とは、固相内の該スパーサーとの結合に利用される1つの官能基からリガンド内に存在する該スパーサーとの結合に利用される1つの官能基までの間に存在することを意図する。また当該親水性スパーサーは、結果的に固相担体と分子Aとの間に介在する基として機能し得るものであれば2以上の化合物を順次、結合、重合させることによって得られるものであつても構わない。好ましくは単位化合物の重合反応によって得られる。2以上の化合物を結合あるいは重合させる過程は好ましくは固相上で行われる。固相担体と親水性スパーサーとの結合、親水性スパーサーと分子Aとの結合、ならびに親水性スパーサーを構成する各成分の結合や重合はアミド結合や、シッフ塩基、C-C結合、エステル結合、水素結合、疎水相互作用等の共有結合あるいは非共有結合であり、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。

【0018】

本発明において、非特異的な相互作用の抑制手段として固相担体と分子Aとの間に導入させる親水性スパーサーとしては、固相担体における固相表面の疎水的な性質を変化させ、非特異的な相互作用を排除するかあるいは抑制するようなも

のであれば特に限定されないが、好ましくは固相担体および分子Aと結合した状態（以下、このような状態にある親水性スペーサーを便宜上「親水性スペーサー部分」と称する）で水素結合アクセプター（HBA; hydrogen bond acceptor）数が6以上であるか、水素結合ドナー（HBD; hydrogen bond donor）数が5以上であるか、あるいは該スペーサー1分子あたりのHBA数およびHBD数の総計が9以上の化合物である。またこれらの条件を2つもしくは全て満たすような化合物であってもよい。特に好ましくはHBA数は9以上であり、HBD数は6以上である。

【0019】

ここで、水素結合アクセプター数（HBA数）とは、含まれる窒素原子（N）と酸素原子（O）の総数であり、水素結合ドナー数（HBD数）とは、含まれるNHとOHの総数である（C.A.Lipinski et al., Advanced Drug Delivery Reviews 23(1997)3-25）。本発明においては、固相担体と分子Aとの間に介在する基であっても、固相担体に由来する（すなわち固相合成時にあらかじめ導入されており固相担体の一部とみなされるもの）NHやOHはそれぞれHBA数やHBD数に含めない。また、分子Aと親水性スペーサーとの結合をより容易にする為に分子Aと親水性スペーサーの間に任意の基を親水性スペーサーとの結合の前あらかじめ分子Aに結合あるいは導入することができるが、これらは分子Aに応じて適宜選択されるものであって、固相担体の疎水的な性質の緩和への寄与が少ないと考えられるので、当該基に含まれるNやO、あるいはNHやOHも本発明におけるHBD数やHBA数には含めない。尚、分子Aと親水性スペーサーの間への任意の基の導入も上述したような種々の共有結合あるいは非共有結合が利用され、いずれも当分野で公知の材料ならびに反応により実施される。

【0020】

HBA数が6以上（好ましくは9以上）、HBD数が5以上（好ましくは6以上）、HBA数とHBD数の総計が9以上、というこれらの条件を少なくとも1つ、好ましくは2つ以上満たさなければ、非特異的な相互作用を十分に抑制することができず、固相担体への非特異的な吸着が生じる。従って、本願発明の親水性スペーサーにおいて「親水性」とは上記の性質を満たすことを意味する。本発

明において親水性スパーサーのHBD数あるいはHBA数の上限としては、親水性であり且つ非特異的相互作用を抑制することができるものであれば特に限定されるものではなく、適切に重合反応等を繰り返すことにより極めて高い親水性を有するスパーサーを得ることができる。また、該スパーサーはタンパク質等の高分子であってもよく、そういった観点から、いずれも5万程度の値を上限とする。

【0021】

さらに本発明において使用する親水性スパーサーは、それ自体非特異的な相互作用（例えば該スパーサーへのタンパク質の吸着等）を生じるものでないことが好ましい。具体的には、該スパーサーが水溶液中で電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有さないことであり、当該官能基としてはアミノ基（ただし、該アミノ基に該アミノ基の塩基性を減弱させる官能基（例えばカルボニル基、スルフォニル基）が結合している場合は除く）、カルボキシ基、硫酸基、硝酸基、ヒドロキサム酸基等が挙げられる。ここで水溶液中とは、具体的には、固相上での分子Aと分子Bとの相互作用を解析する過程、分子Bを選別する過程、あるいは分子Bをスクリーニングする為に実施される分子Aと分子Bとの結合反応（特異相互作用反応）が行われる環境下であって、親水性スパーサーが電荷的に陽性あるいは陰性になるような官能基を有する場合にはイオン化するような条件下である。かかる条件は、例えば水溶液中、pH1～11、温度0～100℃であり、好ましくはpH中性付近（pH6～8）、約4℃～約40℃程度である。

【0022】

上記親水性スパーサーを少なくとも1種固相担体に固定化する。固相担体上のスパーサーの数は特に限定されず、分子Aの種類や量および分子Bの種類や量、ならびに使用するスパーサーの種類や特性に応じて当業者は適宜設定することができる。通常、固相ならびに分子Aに対して過剰量用いて固定化する。固相担体に結合しなかった親水性スパーサーは、固相担体の洗浄等の処理により反応系から容易に排除できる。

【0023】

本発明において固相担体に固定化する分子A（リガンド）は特に限定されず、

公知の化合物であっても今後開発される新規な化合物であってもよい。また、低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。ここで低分子化合物とは分子量1000未満程度の化合物であって、例えば医薬品として通常使用し得る有機化合物およびその誘導体や無機化合物が挙げられ、有機合成法等を駆使して製造される化合物やその誘導体、天然由来の化合物やその誘導体、プロモーター等の小さな核酸分子や各種の金属等であり、望ましくは医薬品として使用し得る有機化合物およびその誘導体、核酸分子をいう。また、高分子化合物としては分子量1000以上程度の化合物であって、タンパク質、ポリ核酸類、多糖類、およびこれらを組み合わせたものなどが挙げられ、望ましくはタンパク質である。これらの低分子化合物あるいは高分子化合物は、公知のものであれば商業的に入手可能であるか、各報告文献に従って採取、製造、精製等の工程を経て得ることができる。これらは、天然由来であっても、また遺伝子工学的に調製されるものであってもよく、また半合成等によっても得ることができる。

【0024】

本発明では、上記分子Aを固定化した固相上で該分子Aとの特異的相互作用に基づいて分子Bを選別する過程を要する。従って分子Bは、分子Aと特異的に相互作用するものであれば特に限定されるものではなく、公知化合物である場合もあれば新規物質である場合も予想される。分子Bとしては低分子化合物であっても高分子化合物であってもかまわない。分子Bが低分子化合物の場合には、低分子化合物である分子Aとの低分子化合物と低分子化合物との特異的相互作用に基づき、あるいは高分子化合物である分子Aとの高分子化合物と低分子化合物との特異的相互作用に基づき、分子Bが選別され得る。また分子Bが高分子化合物の場合には、低分子化合物である分子Aとの低分子化合物と高分子化合物との特異的相互作用に基づき、あるいは高分子化合物である分子Aとの高分子化合物と高分子化合物との特異的相互作用に基づき、分子Bが選別され得る。好ましい分子Aと分子Bの組み合わせは低分子化合物と高分子化合物、あるいは高分子化合物と高分子化合物という組み合わせである。

【0025】

分子Bとの相互作用の解析、ならびに分子Bの選別は簡便には固相上で行う。

分子Bとして予め候補物質が予測される場合には、候補物質を単独で上記固相に固定化された分子Aと接触させ両者の相互作用を測定し、候補物質が分子Bであるか否か、すなわち分子Aのターゲット分子であるか否かを判断すればよいが、通常、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）を含む試料を分子Aと接触させ、複数の物質（高分子化合物および／または低分子化合物）の各々と分子Aとの相互作用の有無ならびにその相互作用の程度を測定することにより分子Bであるか否かを判断し、選別する。ここで複数の物質を含む試料としては、全て公知化合物から構成されるものであっても、一部新規な化合物を含むものであっても、さらには全て新規な化合物から構成されるものであってもよい。しかしながら、リガンドのターゲット分子の探索、あるいは昨今のプロテオーム解析の進歩によれば、全てその構造が公知な化合物の混合物であることが望ましい。全て公知な化合物から構成される試料としては、大腸菌等によって遺伝子工学的に調製されたタンパク質の混合物等であり、一部新規な化合物を含むものとしては、細胞や組織の抽出物（Lysate）であり、また全て新規な化合物から構成されるものとしては、まだその機能や構造が知られていない新規なタンパク質や新しく合成された化合物等の混合物が挙げられる。試料が混合物の場合、特に公知化合物を含む場合には、任意にこれらの化合物の試料中の含有量を所望の値に設定しておくこともできる。リガンドのターゲット分子の探索という見地にたてば、選別すべき分子Bは、低分子化合物ならびに高分子化合物であるのが好ましく、ヒト等の動物体内でのターゲット分子の探索についていえば高分子化合物であることが好ましい。

【0026】

本発明は、上記固相に固定化された分子Aを用いて、当該分子Aに特異的な相互作用を有する分子Bをスクリーニングする方法を提供する。該スクリーニング方法は以下の工程を少なくとも含む。尚、本スクリーニング法における、分子Aおよび分子Bや固相担体、ならびに親水性スパーサーの各々の定義は上記した通りである。

(1) 分子Aを固相担体に親水性スパーサーを介して固定化する工程。

当該工程は、分子Aと親水性スパーサーとの結合、親水性スパーサーと固相担

体との結合からなる。分子Aに親水性スパーサーを結合させて、その後それらの複合体を固相担体に結合させてもよいし、固相担体に親水性スパーサーを結合させてから分子Aを結合させてもよく、分子Aが固相担体に固定化されたか否かは、分子A、あるいは分子Aに予め結合・導入された任意の基に含まれるある特定の構造乃至置換基等に基づく呈色反応等を利用して確認することができる。例えばアミノ基を認識するニンヒドリン反応等が利用できる。個々の結合は、通常当分野で実施される反応を利用して実施される。簡便且つ確実な手段としてアミド結合形成反応を利用する方法が挙げられる。本反応は、例えば「ペプチド合成の基礎と実験」(ISBN 4-621-02962-2、丸善、昭和60年初版)に従って実施できる。各反応に用いられる試薬や溶媒については当分野で通常用いられるものが利用でき、採用する結合反応によって適宜選択される。

【0027】

(2) 分子Bを含むかまたは含まない試料を上記(1)で得られた分子Aが固定化された固相担体に接触させる工程。

本工程において用いる試料は、上記同様、複数の物質を含むものである。その態様は特に限定されず、使用する固相担体や後の工程(3)および(4)の同定方法あるいは解析方法にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えば分子Aが固定化されたビーズ樹脂を充填したカラムを用いる場合には液状とするのが好ましい。分子Bを含まない試料であれば、工程(3)で分子Aに特異的な相互作用を示さなかった分子(複数種存在する場合あり)の同定ならびに解析を行う。分子Bを含む試料であれば、工程(3)で分子Aに特異的な相互作用を示した分子B(複数種存在する場合あり)を同定、解析する。試料と固相担体とを接触させる方法は、試料内の分子Bが固相担体に固定化された分子Aと結合することができれば特に限定されず、使用する固相担体や後の工程(3)および(4)の同定方法あるいは解析方法にどのような原理や手段、方法を用いるかによって適宜変更し得る。例えば分子Aが固定化されたビーズ樹脂を充填したカラムを用いる場合には、液状にした試料をカラムに添加しカラム内を通すことにより簡便に実施される。

【0028】

(3) 分子Aに特異的な相互作用を示したか、または示さなかった分子を同定し、解析する工程。

かかる工程は、使用する固相担体や固定化した分子Aの種類等によって適宜変更し得るが、通常当分野で実施されている低分子化合物あるいは高分子化合物を同定する為の各種方法により行う。また、今後開発されるであろう方法によっても実施可能であろう。例えば分子Aが固定化された固相担体として分子Aが固定化されたビーズ樹脂を充填してなるカラムを用いた場合〔工程(1)〕、続く試料の添加により〔工程(2)〕、分子Aに分子Bを結合させる。結合した分子Bを緩衝液の極性を変える、あるいは過剰の分子Aをさらに加える等の処理によって分子Aから解離させ、その後同定したり、あるいは固相上の分子Aと結合した状態でそのまま界面活性剤等によって抽出して同定したりすることもできる。同定方法としては具体的には電気泳動法、免疫学的反応を用いたイムノプロッティングや免疫沈降法、クロマトグラフィー、マススペクトラム、アミノ酸シーケンス、NMR(低分子のときに特に)等の公知の手法により、またこれらの方法を組み合わせて実施する。分子Aに結合しない分子を同定する工程も上記分子Aに結合する分子を同定する方法に準じて行うことができるが、カラムの素通り画分に含まれる分子を同定の対象とするので、同定工程に入る前に予め濃縮や粗精製等の処理を行うことが好ましい。得られたデータならびに既存の報告をもとに各分子を同定し、分子Aのターゲット分子であるか否かを判断する。

また、本工程は自動化されていてもよい。例えば2次元電気泳動で得られた種々の分子のデータを直接読み取り、既存のデータベースに基づいて分子の同定を行うことも可能である。

【0029】

【実施例】

以下、製造例ならびに実施例、実験例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。尚、各構造式中の略語は以下の通りである。

Me: メチル基

Et: エチル基

Tr: トリチル基

Bn: ベンジル基

TBDPS: t-ブチルジフェニルシリル基

Fmoc: 9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基

TBS: t-ブチルジメチルシリル基

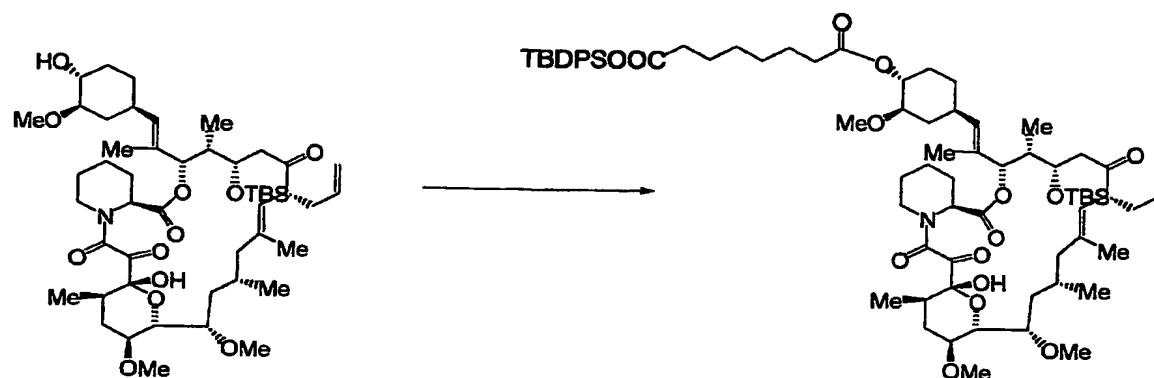
TOYO-Pearl resin: TOYOパール樹脂

【0030】

製造例1: 17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシカルボニル)ヘプタノイルオキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオンの合成

【0031】

【化1】



【0032】

17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-[2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシシクロヘキシル)-1-メチルビニル]-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン (FK5

06; 138 mg, 0.15 mmol)、O-モノ (tert-ブチル-ジメチル-シラニル) オクタン二酸 (86.7 mg, 0.218 mmol)、ジメチルアミノピリジン (DMAP; 16.5 mg, 0.098 mmol)、1-[3-(ジメチルアミノ) プロピル]-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (EDC/HCl; 69.1 mg, 0.261 mmol) および塩化メチレン (CH_2Cl_2 ; 1 ml) の混合物を室温で1.5時間攪拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機相を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム (MgSO_4) で乾燥した。 MgSO_4 を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し (20% AcOEt (n-ヘキサン中) で溶出)、目的とする17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ-カルボニル) ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオン (44 mg, 24.6%) を得た。

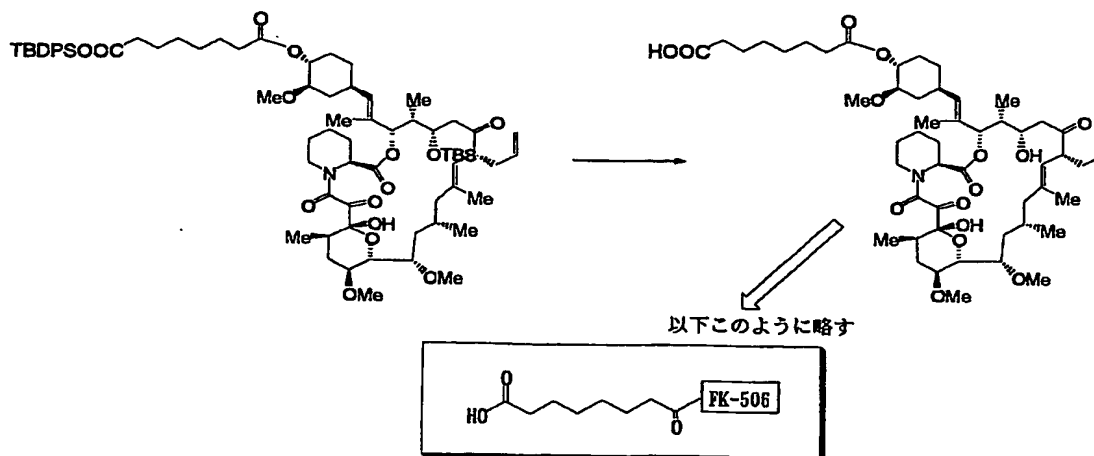
$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : -0.1-0.1 (12H, m), 0.7-2.6 (47H, m), 0.85 and 0.86 (18H, s), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75 (1H, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0-4.4 (6H), 4.5-5.8 (9H, m).

【0033】

製造例2: 17-アリル-14-(tert-ブチル-ジメチル-シラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシ-ヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシ-シクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23, 25-ジメトキシ-13, 19, 21, 27-テトラメチル-11, 28-ジオキサ-4-アザトリシクロ [22.3.1.0^{4,9}] オクタコス-18-エン-2, 3, 10, 16-テトラオンの合成

【0034】

【化2】



【0035】

製造例1で調製した17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシカルボニル)ヘプタノイルオキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン(44mg, 0.037mmol)とアセトニトリル(0.88ml)の混合物に46-48%のフッ化水素(HF)水(0.12ml)を静かに加え室温にて終夜撹拌した。反応物を酢酸エチル-水混合液に注ぎ、抽出した。得られた有機相を水、食塩水で洗浄後、硫酸マグネシウム(MgSO₄)で乾燥した。MgSO₄を濾別後、減圧下濃縮した。こうして得られた残渣をシリカゲルカラムで精製し(5%メタノール(クロロホルム中))、目的とする17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシラニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシヘプタノイルオキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチルビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン(14.2mg, 40%)を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 0.7-2.6 (47H, m), 1.50 (3H, s), 1.63 (3H, s), 2.75 (1H

, m), 3.31 (3H, s), 3.35 (3H, s), 3.39 (3H, s), 4.05 (1H, m), 3.0-4.4 (6 H), 4.5-5.8 (11H, m).

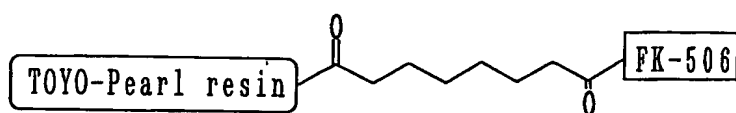
MS(m/z): 960(M⁺)

【0036】

製造例3: FK506付TOYOパール樹脂(TSK gel AF-amino)の合成

【0037】

【化3】



【0038】

製造例2で調製した17-アリル-14-(tert-ブチルジメチルシリニルオキシ)-1-ヒドロキシ-12-{2-[4-(7-カルボキシーヘプタノイル-オキシ)-3-メトキシシクロヘキシル]-1-メチル-ビニル}-23,25-ジメトキシ-13,19,21,27-テトラメチル-11,28-ジオキサ-4-アザトリシクロ[22.3.1.0^{4,9}]オクタコス-18-エン-2,3,10,16-テトラオン(38.4mg, 0.04mmol)、TOYOパール樹脂(TSK gel AF-amino, 100μl, 遊離アミノ基(available amino group)は0.01mmol)、EDC/HCl(9.2mg, 0.048mmol)、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt; 6.5mg, 0.048mmol)およびジメチルホルムアミド(DMF; 1ml)の混合物を室温で6時間攪拌した。反応の終点はニンヒドリン反応で残存アミノ基が肉眼で観測できなくなることで確認した。この時の反応率を換算すると約82%であった。反応終了確認後、DMFで樹脂を5回洗浄した。ここに無水酢酸(100μl)およびDMF(400μl)を加え1時間室温で攪拌した。その後DMFで十分洗浄し、得られたFK506付TOYOパール樹脂は後述する結合実験に用いた。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は4、HBD数は3である(但し、FK506にあらかじめ導入され

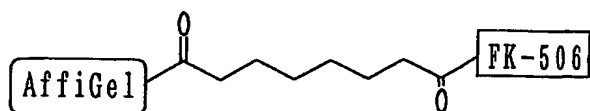
た基に由来する分は数に入れない)。

【0039】

製造例4: FK506付AffiGel樹脂の合成

【0040】

【化4】



【0041】

TOYOパール樹脂の代わりにAffiGel樹脂 (Bio-Rad社) を用いる以外は製造例3と同様な手法によりFK506付AffiGel樹脂を合成した。得られたFK506付AffiGel樹脂は後述する結合実験に用いた。AffiGel樹脂とFK506の間に介在する基のHBA数は3、HBD数は2である (但し、FK506にあらかじめ導入された基に由来する分は数に入れない)。

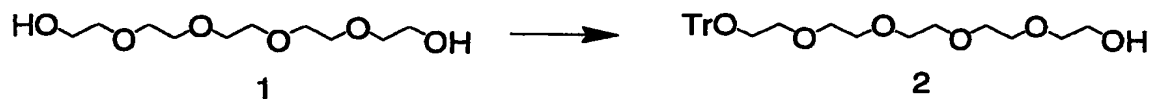
【0042】

製造例5: 親水性スパーサー分子の合成(1-1)

2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)エタノールの合成

【0043】

【化5】



【0044】

ペンタエチレングリコール (化合物1; 10 g, 42.0 mmol) をピリジン (100 ml) に溶解し、トリフェニルメチルクロリド (11.6 g, 41.6 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (0.9 g, 7.4 mmol) を室温で加えた後、35℃で終夜攪拌した。これを減圧濃縮して得られた残渣をク

クロロホルムに溶解し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（関東化学 60N；600ml）に供し、溶出液（60：1 クロロホルム（CHCl₃）－メタノール（MeOH）にて目的の2－（2－{2－[2－（2－トリチルオキシ－エトキシ）－エトキシ]－エトキシ}－エトキシ）エタノール（化合物2；10.4g，51.2%）を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 2.53 (1H, t), 3.16 (2H, t), 3.49-3.63 (18H, m), 7.14-7.41 (15H, m).

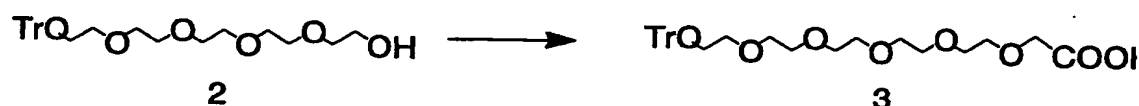
【0045】

製造例6：親水性スパーサー分子の合成(1-2)

[2－（2－{2－[2－（2－トリチルオキシ－エトキシ）－エトキシ]－エトキシ}－エトキシ）エタノール（化合物2；10.4g，51.2%）酢酸の合成

【0046】

【化6】



【0047】

製造例5で得られた化合物2（10.2g，21.2mmol）をテトラヒドロフラン（THF；200ml）及びDMF（50ml）の混合溶媒に溶解し、0℃にて水素化ナトリウム（3.1g；油性，60wt%）を少しずつ加えた後、室温で30分間攪拌した。これを0℃に冷却した後、ブromo酢酸（6.5g，46.8mmol）を少しずつ加え、室温で30分間攪拌した。その後更に水素化ナトリウム（11.6g；油性，60wt%）を室温で少しずつ加えて室温で1時間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、水（25ml）を徐々に加えた後、反応液の量が約100mlになるまで減圧濃縮した。これに酢酸エチル（200ml）及び、食塩水（100ml）を加え、攪拌しながら2M硫酸水素カリウム水を加え、pHを6に調製した。有機相を抽出し、30℃にて減圧濃縮して得られ

た残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（関東化学 60N; 400 ml）に供し、溶出液（85:15 CHCl₃-MeOH）にて目的の〔2-（2-〔2-（2-トリチルオキシ-エトキシ）-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕酢酸（化合物3）の粗精製物（12.4 g）を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.34 (2H, t), 3.76-3.84 (20H, m), 4.13 (2H, s), 7.30-7.83 (15H, m).

【0048】

製造例7: 親水性スパーサー分子の合成(1-3)

〔2-（2-〔2-〔2-（2-トリチルオキシ-エトキシ）-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕酢酸 ベンジルエステルの合成

【0049】

【化7】



【0050】

製造例6で得られた化合物3の粗精製物（12.4 g）を塩化メチレン（100 ml）に溶解し、4-ジメチルアミノピリジン（0.29 g, 2.4 mmol）、ベンジルアルコール（3.1 ml, 30.0 mmol）を加えた。これを0℃に冷却し、水溶性カルボジイミド（N-エチル-N'-（3'-ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド; WSC; 4.5 g, 23.5 mmol）を加え、室温にて終夜攪拌した。反応液をクロロホルムで抽出し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（関東化学 60N; 600 ml）に供し、溶出液（1:1 酢酸エチル-ヘキサン）にて目的の〔2-（2-〔2-〔2-（2-トリチルオキシ-エトキシ）-エトキシ〕-エトキシ〕-エトキシ〕酢酸 ベンジルエステル（化合物4; 12.0 g, 90.1%, 2 steps）を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 3.16 (2H, t), 3.55-3.65 (20H, m), 4.11 (2H, s), 5.11 (2H, s), 7.15-7.40 (20H, m).

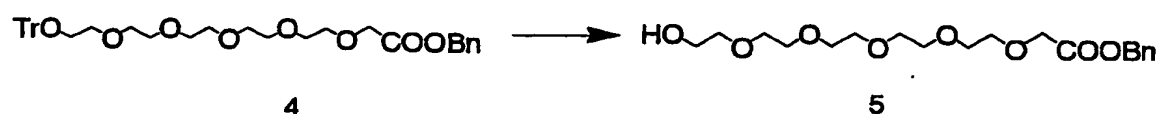
【0051】

製造例 8: 親水性スパーサー分子の合成(1-4)

[2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステルの合成

【0052】

【化 8】



【0053】

製造例 7 で得られた化合物 4 (12.0 g) を 5% トリフルオロ酢酸塩化メチレン溶液 (150 ml) に溶解し、0℃にて水 (10 ml) を加えて、0℃にて 20 分間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水に注いで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60N; 400 ml) に供し、溶出液 (1000:15 CHCl_3 -MeOH) にて目的の [2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステル (化合物 5; 7.0 g, 95%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3)$ δ : 2.80 (1H, t), 3.62-3.76 (20H, m), 4.22 (2H, s), 5.20 (2H, s), 7.36-7.41 (5H, m).

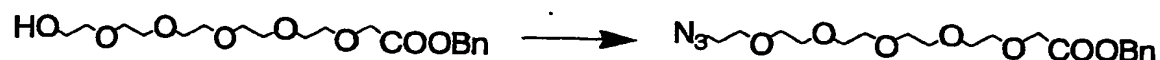
【0054】

製造例 9: 親水性スパーサー分子の合成(1-5)

[2-(2-{2-[2-(2-アジド-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 ベンジルエステルの合成

【0055】

【化9】



5

6

【0056】

製造例8で得られた化合物5 (7.0 g, 18.1 mmol) 及び、4-ジメチルアミノピリジン (0.4 g, 3.3 mmol) をピリジン (45 ml) に溶解し、0℃に冷却した。これにp-トルエンスルホニルクロリド (5.2 g, 27.2 mmol) を加えて室温で終夜攪拌し、更にp-トルエンスルホニルクロリド (3.1 g, 16.2 mmol) 及び4-ジメチルアミノピリジン (120 mg, 0.98 mmol) を加えて30℃で2時間攪拌した。反応液を0℃に冷却し、水 (3 ml) を加えて減圧濃縮し、得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、酢酸エチルで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をDMF (50 ml) に溶解し、アジ化ナトリウム (11.8 g, 0.18 mol) を加えて60℃で1時間攪拌した。反応液を酢酸エチルで抽出し、有機相を飽和炭酸水素ナトリウム水、及び飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、酢酸エチルで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (関東化学 60N; 250 ml) に供し、溶出液 (3:1 酢酸エチル-ヘキサン) にて目的の [2-(2-{2-[2-(2-アジド-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸ベンジルエステル (化合物6; 3.3 g, 44.3%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 3.31 (2H, t), 3.54-3.87 (20H, m), 4.13 (2H, s), 5.12 (2H, s), 7.20-7.30 (5H, m).

【0057】

製造例10: 親水性スパーサー分子の合成(1-6)

[2-(2-{2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸の合成

【0058】

【化10】



6

7

【0059】

製造例9で得られた化合物6 (1.94 g, 4.72 mmol) をメタノール (50 ml) に溶解し、10% Pd-C (500 mg) を加えて、室温で2.5時間接触水素添加を行った。固形物をセライトろ過にて除去し、メタノールで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮して目的の [2- (2- {2- [2- (2-アミノ-エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} -エトキシ) -エトキシ] 酢酸 (化合物7; 1.4 g, 定量的) を得た。

MS (m/z): 296 (M⁺)

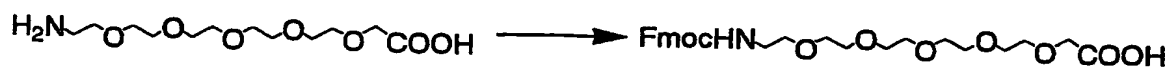
【0060】

製造例11: 親水性スパーサー分子の合成(1-7)

{2- [2- (2- {2- [2- (9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ) -エトキシ] -エトキシ} -エトキシ) -エトキシ] -エトキシ} 酢酸の合成

【0061】

【化11】



7

8

【0062】

製造例10で得られた化合物7 (1.25 g, 4.23 mmol) を10%炭酸ナトリウム水 (14 ml) に溶解し、ジメトキシエタン (14 ml) に懸濁した9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネート (2.15 g, 6.37 mmol) を室温で滴下した後、室温で終夜攪拌した。固形物をセライトにて

ろ別後、クロロホルムで洗浄した。ろ液と洗液を合わせてクロロホルムで抽出し、有機相を2M硫酸水素ナトリウム水、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物を綿ろ過にて除去し、クロロホルムで洗浄し、ろ液と洗液を合わせて減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー（関東化学 60N; 150ml）に供し、溶出液（1000:7 CHCl₃-MeOH）にて目的の {2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ} 酢酸（化合物8; 1.38g, 63.0%）を得た。

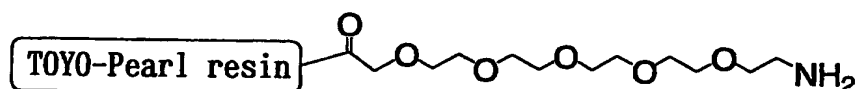
¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.34 (2H, t), 3.50-3.71 (18H, m), 4.05 (2H, s), 4.12 (1H, t), 4.33 (2H, d), 5.57 (1H, s), 7.22-7.95 (8H, m).

【0063】

製造例12: 親水性スパーサー付樹脂の合成: ヘキサエチレングリコール誘導体付TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) の合成

【0064】

【化12】



【0065】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino; 100 μl 中に 0.01 mmol のアミンが存在) に塩化メチレン (0.4 ml) と N-メチル-2-ピロリドン (NMP; 0.1 ml) の混合溶媒に溶解した {2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ} 酢酸（製造例11 で得られた化合物8; 21 mg, 0.04 mmol）を加え、更にベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノー-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 26 mg, 0.05 mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μl, 0.10 mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した

後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した（約 81 %）。得られた樹脂に無水酢酸／塩化メチレン／NMP（1／8／2）の混合溶液（0.5 ml）を加えて室温で 3 時間振とうした。樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、ピペリジン／DMF／塩化メチレン（1／4／4）の混合溶液（0.5 ml）を加えて室温で 3 時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより樹脂 100 μ l 中に約 7.9 μ mol のアミンが存在することを確認した。

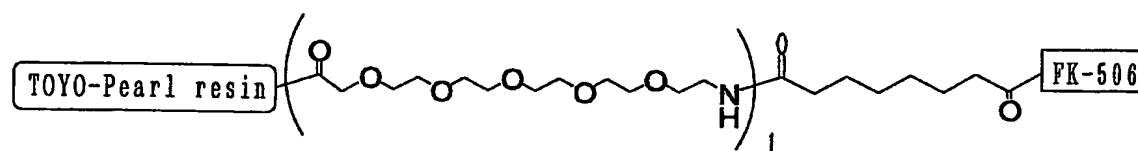
【0066】

製造例 13：FK506 誘導体結合型親水性スペーサー付樹脂の合成

(TOYO + (PEG)₁-FK506)

【0067】

【化 13】



【0068】

製造例 12 で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付 TOYO パール樹脂を用い、製造例 3 で述べた方法に準じて親水性スペーサーを有する FK506 結合型樹脂〔TOYO + (PEG)₁-FK506〕を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スペーサー部分の HBA 数は 11、HBD 数は 4 である。

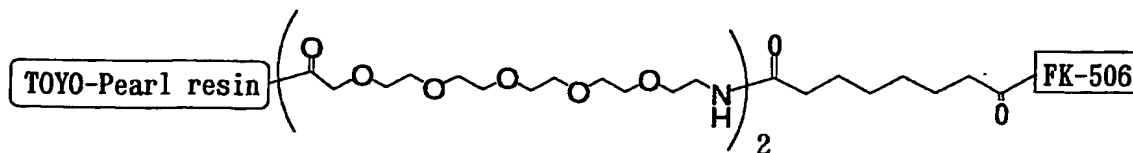
【0069】

製造例 14：FK506 誘導体結合型親水性スペーサー付樹脂の合成

(TOYO + (PEG)₂-FK506)

【0070】

【化14】



【0071】

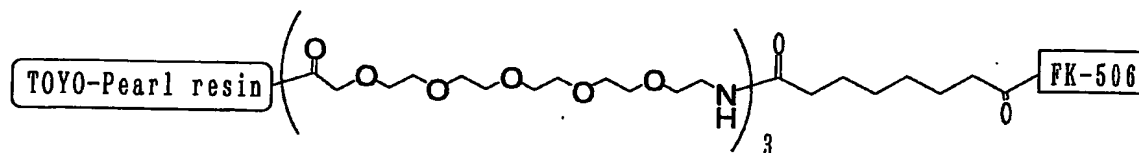
製造例12で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付TOYOパール樹脂を用い、製造例12に従い親水性スパーサーの伸長反応を行った後、製造例3で述べた方法に準じて親水性スパーサーを有するFK506結合型樹脂〔TOYO + (PEG)₂-FK506〕を合成した。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する親水性スパーサー部分のHBA数は18、HBD数は5である。

【0072】

製造例15：FK506誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成
(TOYO + (PEG)₃-FK506)

【0073】

【化15】



【0074】

製造例12で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付TOYOパール樹脂を用い、製造例12に従い親水性スパーサーの伸長反応をくり返し行った後、製造例3で述べた方法に準じて親水性スパーサーを有するFK506結合型樹脂〔TOYO + (PEG)₃-FK506〕を合成した。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する親水性スパーサー部分のHBA数は25、HBD数は6である。

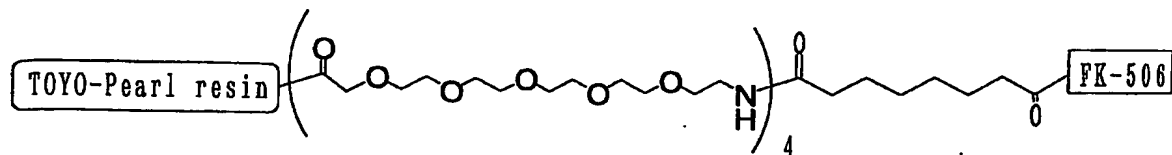
【0075】

製造例16：FK506誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成

(TOYO+ (PEG)₄-FK506)

【0076】

【化16】



【0077】

製造例12で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付TOYOパール樹脂を用い、製造例12に従い親水性スペーサーの伸長反応をくり返し行った後、製造例3に述べた方法に準じ、親水性スペーサーを有するFK506結合型樹脂〔TOYO+ (PEG)₄-FK506〕を合成した。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する親水性スペーサー部分のHBA数は32、HBD数は7である。

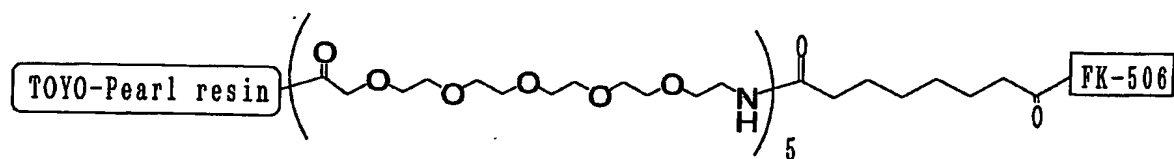
【0078】

製造例17: FK506誘導体結合型親水性スペーサー付樹脂の合成

(TOYO+ (PEG)₅-FK506)

【0079】

【化17】



【0080】

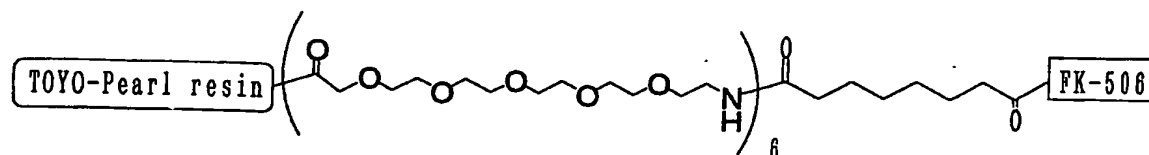
製造例12で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付TOYOパール樹脂を用い、製造例12に従い親水性スペーサーの伸長反応をくり返し行った後、製造例3に述べた方法に準じ、親水性スペーサーを有するFK506結合型樹脂〔TOYO+ (PEG)₅-FK506〕を合成した。TOYOパール樹脂とFK506の間に介在する親水性スペーサー部分のHBA数は39、HBD数は8である。

【0081】

製造例 18: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成
(TOYO+ (PEG)₆-FK506)

【0082】

【化18】



【0083】

製造例 12 で得られたヘキサエチレングリコール誘導体付 TOYO パール樹脂を用い、製造例 12 に従い親水性スパーサーの伸長反応をくり返し行った後、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スパーサーを有する FK506 結合型樹脂〔TOYO+ (PEG)₆-FK506〕を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スパーサー部分の HBA 数は 46、HBD 数は 9 である。

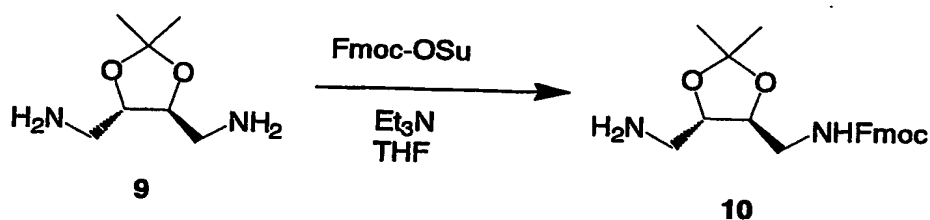
【0084】

製造例 19: 親水性スパーサー分子の合成(2-1)

(5S-アミノメチル-2,2-ジメチル-[1,3]ジオキソラン-4S-イルメチル)カルバミン酸 9H-フルオレン-9-イルメチル エステル (化合物 10) の合成

【0085】

【化19】



【0086】

化合物 9 (1.0 g, 6.25 mmol) を THF 20 ml に溶解し、氷冷下攪拌した。その反応系中に 9-フルオレニルメチルスクシンイミジルカルボネート (Fmoc-OSu; 2.1 g, 6.25 mmol) を THF 10 ml にて溶

解し、ゆっくりと滴下した。引き続きトリエチルアミンを滴下後、氷冷下30分間攪拌した。反応終了後、水を加え、酢酸エチルにて水相を抽出し、有機相を飽和食塩水にて洗浄した後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。得られた有機相を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (BW-820MH; 富シリア化学、展開溶媒 (10:1=酢酸エチル:エタノール)) にて精製し目的の化合物10 (1.22 g) を収率52.8%にて得た。

MS (m/z): 383 (MH^+), 1H -NMR(DMSO d_6) δ : 1.30 (s, 6H), 2.68 (d, 2H), 3.07 (m, 2H), 3.63-3.6 (m, 1H), 3.69-4.02 (m, 1H), 4.04-4.21 (m, 1H), 4.29 (m, 2H), 7.33 (m, 2H), 7.42 (t, 2H), 7.70 (d, 2H), 7.89 (d, 2H).

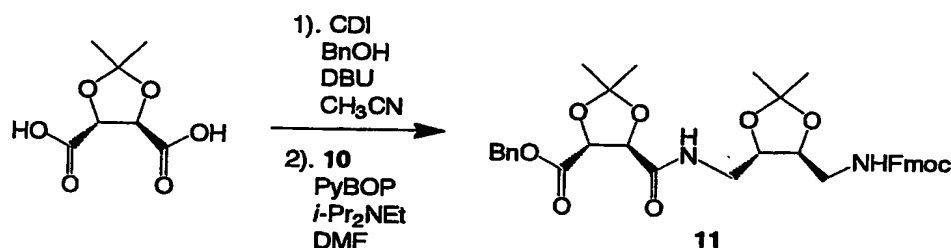
【0087】

製造例20: 親水性スパーサー分子の合成(2-2)

5R- ({5S- [(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-メチル] -2, 2-ジメチル- [1, 3] ジオキソラン-4R-イルメチル } -カルバモイル) -2, 2-ジメチル- [1, 3] ジオキソラン-4S-カルボン酸 ベンジルエステル (化合物11) の合成

【0088】

【化20】



【0089】

2, 2-ジメチル- [1, 3] ジオキソラン-4R, 5R-ジカルボン酸 (740 mg, 3.89 mmol) をアセトニトリル 50 ml に溶かし、1, 1'-カルボニルジイミダゾール (CDI; 1.26 g, 7.78 mmol) を添加し室温にて30分間攪拌した。その反応系中にベンジルアルコール (BnOH; 420 mg, 3.89 mmol), 1, 8-ジアザビシクロ [5.4.0] ウンデカー7-エン (DBU; 887 mg, 5.84 mmol) を加え、室温にて17

時間攪拌した。反応終了後、反応溶液中に水を加え、さらに1N-塩酸にて弱酸性とした。反応液を酢酸エチルにて抽出し、抽出した有機相を飽和食塩水にて洗浄後、無水硫酸マグネシウムにて乾燥した。得られた有機相を減圧濃縮後、目的のモノベンジルエステル体を得た。精製することなく得られたモノベンジルエステル体をDMF 100 ml に溶かし、製造例19で得られた化合物10 (1.2 g, 3.14 mmol) をDMF 10 ml に溶かし反応系中に加えた。ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノー-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 3.37 g, 6.48 mmol)、ジイソプロピルエチルアミン (*i*-Pr₂NEt; 1.25 g, 9.74 mmol) を加え、室温にて17時間攪拌した。反応液中に水100 ml を加え、酢酸エチル100 ml にて3回抽出した。抽出した有機相を飽和食塩水にて洗浄し、得られた有機相を無水硫酸マグネシウムにて乾燥後、減圧濃縮した。得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製し、目的の化合物11 (0.49 g) を収率23.5%にて得た。

MS (*m/z*): 645 (MH⁺), ¹H-NMR(CDCl₃) δ : 1.33-1.39 (m, 6H), 1.43 (s, 3H), 1.50 (m, 3H), 3.42 (b, 2H), 3.53 (b, 2H), 3.75 (m, 1H), 4.21 (m, 1H), 4.37-4.48 (m, 2H), 4.76-4.82 (m, 2H), 5.25 (s, 2H), 5.29 (m, 1H), 6.93 (m, 1H), 7.28-7.41 (m, 9H), 7.59 (d, 2H, *J*=7.5Hz), 7.75 (d, 2H, *J*=7.5Hz).

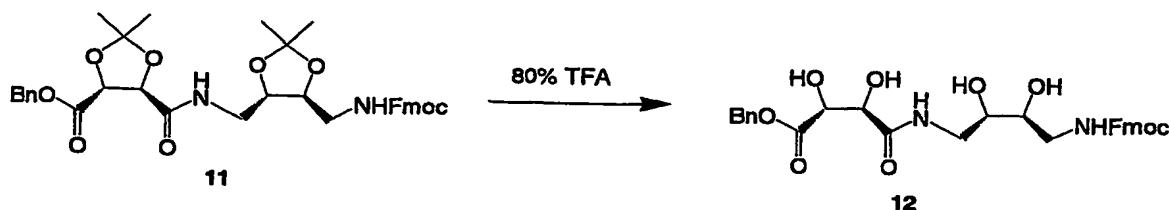
【0090】

製造例21: 親水性スパーサー分子の合成(2-3)

N-[4-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2S, 3S-ジヒドロキシブチル]-2R, 3R-ジヒドロキシースクシンアミド酸ベンジルエステル(化合物12)の合成

【0091】

【化21】



【0092】

化合物11 (0.46 g, 0.71 mmol) を80%トリフルオロ酢酸 (TFA) 水10 ml に溶かし、室温にて5時間攪拌した。反応終了後、溶媒を留去し、ジクロロメタンにて3回共沸した。残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を飽和食塩水にて洗浄した。無水硫酸マグネシウムにて乾燥し、減圧濃縮した。n-ヘキサン-酢酸エチルにて再結晶し、目的の化合物12 (220 mg) を収率5%にて得た。

MS (m/z) : 565 (MH⁺), ¹H-NMR(DMSO d₆) δ: 2.99-3.06 (m, 2H), 3.09-3.19 (m, 2H), 3.44 (m, 2H), 4.18-4.23 (m, 1H), 4.26-4.27 (m, 3H), 4.47 (d, 1H), 4.63 (dd, 2H), 5.15 (dd, 2H), 5.40 (d, 1H), 5.88 (t, 1H), 7.14 (m, 1H), 7.28-7.42 (m, 10H), 7.64 (m, 1H), 7.70 (d, 2H), 7.88 (d, 2H).

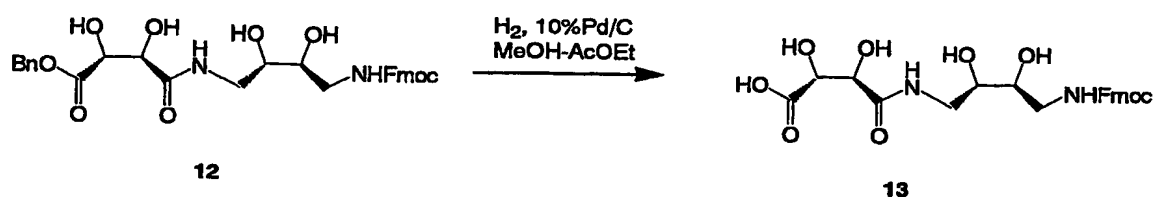
【0093】

製造例22: 親水性スペーサー分子の合成(2-4)

N-[4-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2S, 3S-ジヒドロキシブチル]-2R, 3R-ジヒドロキシースクシンアミド酸 (化合物13) の合成

【0094】

【化22】



【0095】

化合物12 (200 mg, 0.35 mmol) をメタノール-酢酸エチル (1:1) の混合溶媒100 ml に溶かし、10% Pd/C (50%含水) 50 mg を加え、水素気流下室温にて2時間攪拌した。反応終了後、Pd/Cを濾取し、メタノールにて3回洗いこみをした。得られた有機溶媒を減圧濃縮し、目的の化合物13 (165 mg) を定量的に得た。

MS (m/z) : 475 (MH⁺), ¹H-NMR(ACETON d₆) δ: 3.2-3.4 (m, 3H), 3.49-3.70

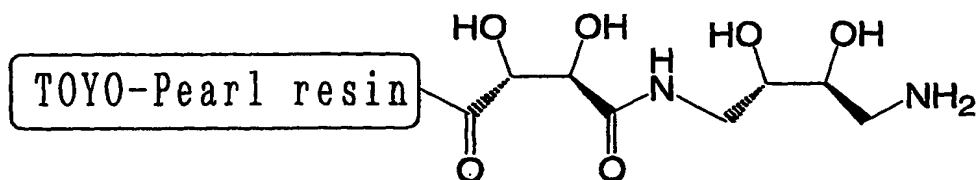
(m, 3H), 4.23 (m, 1H), 4.33-4.35 (m, 2H), 4.46 (m, 1H), 4.60 (m, 1H), 6.50 (m, 1H), 7.33 (t, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.68 (m, 1H), 7.71 (d, 2H), 7.86 (d, 2H).

【0096】

製造例 23：親水性スパーサー付樹脂の合成：ジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド誘導体付 TOYO パール樹脂の合成

【0097】

【化 23】



【0098】

トヨパール樹脂 (TSK gel AF-amino; 100 μ l 中に 0.01 mmol のアミンが存在) にジクロロメタン (0.4 ml)、N-メチル-2-ピロリドン (NMP; 0.1 ml) を加え、さらに、N-[4-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-2R, 3R-ジヒドロキシーブチル]-2R, 3R-ジヒドロキシースクシンアミド酸 (40 mg, 0.08 mmol), ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノーホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 50 mg, 0.096 mmol), N,N-ジイソプロピルエチルアミン (25 mg, 0.192 mmol) を加え、室温で 2 時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率 73.4% を確認した。得られた樹脂に無水酢酸/メタノール/ジクロロメタン (1/1/10) の混合溶液 (1 ml) を加えて室温で 0.5 時間振とうした。樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、ピペリジン/DMF/塩化メチレン (1/4/4) の混合溶液 (0.5 ml) を加えて室温で 3 時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄し、目的のジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO+ (D

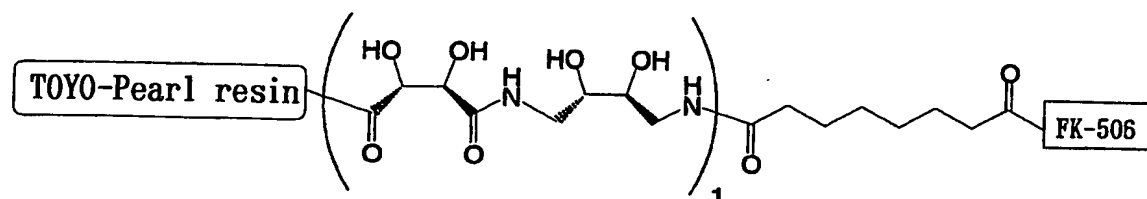
ABT)₁] を得た。

【0099】

製造例 24: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成
(TOYO+ (DABT)₁-FK506)

【0100】

【化 24】



【0101】

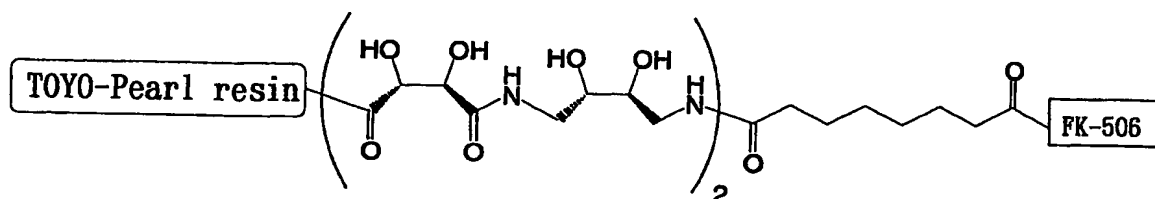
製造例 23 で得られたジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO+ (DABT)₁] より、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スパーサーを有する FK506 結合型樹脂 [TOYO+ (DABT)₁-FK506] を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スパーサー部分の HBA 数は 12、HBD 数は 9 である。

【0102】

製造例 25: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成
(TOYO+ (DABT)₂-FK506)

【0103】

【化 25】



【0104】

製造例 23 で得られたジハイドロキシアミノブチルタータリックアシッド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO+ (DABT)₁] より、製造例 23 に従い親水性スパーサーの伸長反応を行った。ただし、反応溶媒には塩化メチレン (0

． 5 ml) と N-メチル-2-ピロリドン (NMP ; 0.05 ml) の混合溶媒を用いた。次いで、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スパーサーを有する FK506 結合型樹脂 [TOYO + (DABT) 2-FK506] を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スパーサー部分の HBA 数は 20、HBD 数は 15 である。

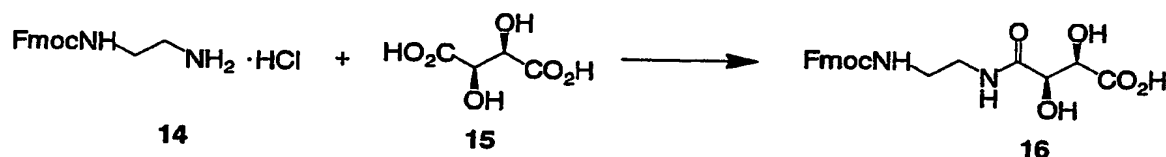
【0105】

製造例 26 : 親水性スパーサー分子の合成 (3-1)

N-[2-(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ)-エチル]-2,3-ジヒドロキシースクシンアミド酸 (化合物 16) の合成

【0106】

【化 26】



【0107】

9H-9-フルオレニルメチル N-(2-アミノエチル) カルバメート 塩酸塩 (化合物 14 ; 5.00 g, 153.7 mmol) 及び L-(+)-酒石酸 (化合物 15 ; 5.89 g, 39.2 mmol) に、N,N-ジメチルホルムアミド (300 ml) 及びトリエチルアミン (5.46 ml, 39.2 mmol) を加え、溶解させた。次いで、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール水和物 (2.52 g, 16.5 mmol) を加え、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド 塩酸塩 (3.16 g, 16.5 mmol) の N,N-ジメチルホルムアミド (200 ml) 溶液を滴下した後、室温で終夜攪拌した。これを減圧濃縮して得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を 2 N クエン酸水溶液で洗浄した。次いで、炭酸水素ナトリウム水を用いて逆抽出を行った後、得られた水相を酢酸エチルで洗浄した。氷冷下、2 N クエン酸水溶液にて水相を酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、メタノール-ジエチルエーテルより結晶化を行い、目的とする N-[2-(9H-フルオレン-9-

イルメトキシカルボニルアミノ) - エチル] - 2, 3 - ジヒドロキシースクシンアミド酸 (2.72 g, 42%) を得た。

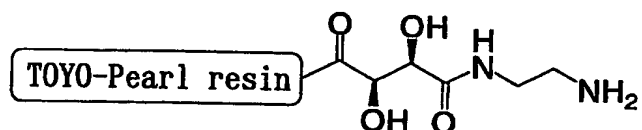
$^1\text{H-NMR}$ (d-acetone) δ : 3.29 (2H, t), 3.37 (2H, t), 4.24 (1H, m), 4.30 (2H, m), 4.41 (1H, d), 4.59 (1H, d), 7.29-7.42 (4H, m), 7.68 (2H, d), 7.85 (2H, d). MS(m/z): 415.2 (M^+).

【0108】

製造例 27: 親水性スパーサー付樹脂の合成: アミノエチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂の合成

【0109】

【化 27】



【0110】

TOYO パール樹脂 (TSK gel AF-amino; $100\mu\text{l}$ 中に 0.01mmol のアミンが存在) に塩化メチレン (0.5ml) を加え、更に製造例 26 で得られた化合物 16 (16.6mg , $40\mu\text{mol}$)、N, N-ジイソプロピルエチルアミン ($16.7\mu\text{l}$, $96\mu\text{mol}$)、PyBOP (25.0mg , $48\mu\text{mol}$) を加え、室温で終夜振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、得られた樹脂に無水酢酸/メタノール/塩化メチレン (1/1/10) の混合溶液 (1.5ml) を加えて室温で 25 分振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄した後、20% ピペリジン/DMF 溶液 (0.5ml) を加えて室温で 10 分振とうした。次いで、樹脂を DMF で洗浄した後、再度、20% ピペリジン/DMF 溶液 (0.5ml) を加えて室温で 20 分振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及び DMF で十分に洗浄し、アミノエチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂 [$\text{TOYO} + (\text{AET})_1$] を得た。

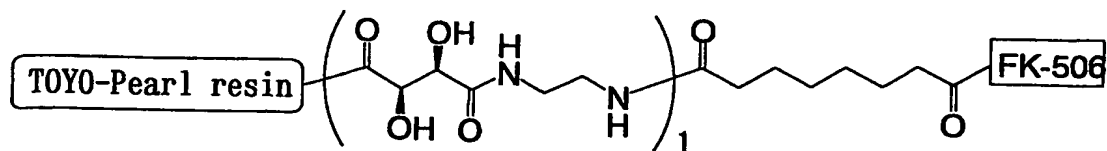
【0111】

製造例 28: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成

(TOYO+ (AET)₁-FK506)

【0112】

【化28】



【0113】

製造例 27 で得られたアミノエチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂〔TOYO+ (AET)₁〕より、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スパーサーを有する FK506 結合型樹脂〔TOYO+ (AET)₁-FK506〕を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スパーサー部分の HBA 数は 10、HBD 数は 7 である。

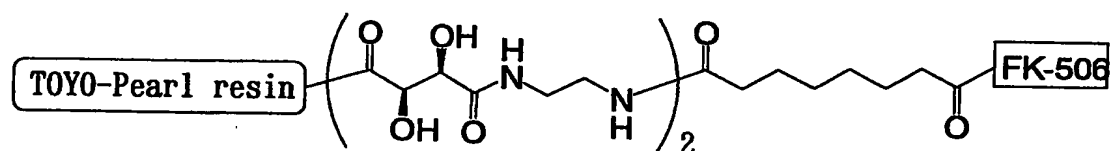
【0114】

製造例 29: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成

(TOYO+ (AET)₂-FK506)

【0115】

【化29】



【0116】

製造例 27 で得られたアミノエチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂〔TOYO+ (AET)₁〕より、製造例 27 に従い親水性スパーサーの伸長反応を行った。ただし、反応溶媒には塩化メチレン (0.5 ml) と N-メチル-2-ピロリドン (NMP; 0.05 ml) の混合溶媒を用いた。次いで、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スパーサーを有する FK506 結合型樹脂〔TOYO+ (AET)₂-FK506〕を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スパーサー部分の HBA 数は 16、HBD 数は 11 である。

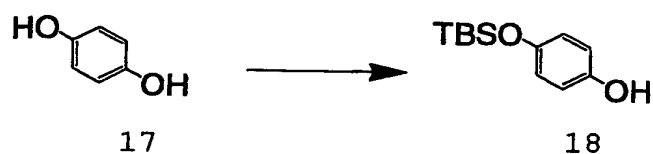
【0117】

製造例 30: 親水性スパーサー分子の合成(4-1)

4-tert-ブチルジメチルシリルオキシフェノール (化合物 18) の合成

【0118】

【化30】



【0119】

氷冷したハイドロキノン (化合物 17; 3.3 g, 30 mmol) の DMF (60 ml) 溶液へ、イミダゾール (3.1 g, 45 mmol) 及び tert-ブチルジメチルシリルクロリド (4.5 g, 30 mmol) の DMF (30 ml) 溶液を加え、氷浴を取り除き室温にて終夜攪拌した。これを水へ注ぎ、反応を停止させた後、エーテルから抽出した。合わせた有機相を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過、減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [Biotage、溶出液 (9:1 n-ヘキサン: 酢酸エチル)] にて精製し、化合物 18 (白色固体 3.6 g, 53%) を得た。

MS(m/z): 225 (MH⁺), ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 0.16 (6H, s), 0.97 (9H, s), 4.43 (1H, s), 6.70 (4H, d, J=2Hz).

【0120】

製造例 31: 親水性スパーサー分子の合成(4-2)

[2-(2-{2-[2-(2-ベンジルオキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)] エタノール (化合物 19) の合成

【0121】

【化31】



【0122】

m, 16H), 3.62-3.72 (20H, m), 3.80 (2H, t, $J=6.4\text{Hz}$), 4.57 (2H, s), 7.26-7.35 (5H, m).

【0126】

製造例 33: 親水性スパーサー分子の合成(4-4)

tert-ブチルジメチル-4-[2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシエトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-フェノキシ]シラン (化合物 21) の合成

【0127】

【化33】



【0128】

化合物 2 (2.8 g, 5.8 mmol) のトルエン (10 mL) 溶液へ、トリブチルフォスフィン (1.17 g, 5.8 mmol) のトルエン (2 mL) 溶液を室温に加え、1時間攪拌した。これを化合物 18 (1.1 g, 4.9 mmol) と、1,1'-アゾビス (N,N-ジメチルホルムアミド) (1.0 g, 5.8 mmol) のトルエン (10 mL) 溶液へゆっくりと加え、室温にて終夜攪拌した。酢酸エチルを加え、生じた不溶物をセライトろ過によって取り除き、酢酸エチルにより洗浄を行った。合わせた有機相を減圧下濃縮し、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YFLC Gel、溶出液 (n-ヘキサン: 酢酸エチル 2:1)) にて精製し、化合物 21 (無色オイル 2.03 g, 60%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 0.16 (6H, s), 0.97 (9H, s), 3.23 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 3.64-3.69 (14H, m), 3.80 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 4.04 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 6.69-6.75 (5H, m), 7.23-7.30 (13H, m), 7.45-7.47 (6H, m)。

【0129】

製造例 34: 親水性スパーサー分子の合成(4-5)

4-[2-(2-{2-[2-(2-トリチルオキシエトキシ)-エトキシ]

—エトキシ} —エトキシ) —エトキシ] フェノール (化合物 22 の合成)

【0130】

【化34】



【0131】

氷冷した化合物 21 (1.88 g, 2.74 mmol) の THF (20 ml) 溶液へ 1 M テトラブチルアンモニウムフルオリド THF 溶液 (4 ml) を加えた。添加終了後、氷浴を外し室温にて 10 分間攪拌した。これを水へ注ぎ、反応を停止させた後、酢酸エチルから抽出した。有機相を合わせて飽和食塩水で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YF LC Gel、溶出液 (n-ヘキサン: 酢酸エチル 2:1 ~ 1:1)) にて精製し、化合物 22 (淡黄色オイル 1.45 g, 92%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 3.23 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 3.64–3.69 (m, 14H), 3.79 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 4.04 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 4.68 (1H, s), 6.71–6.79 (4H, m), 7.20–7.30 (9H, m), 7.45–7.47 (6H, m).

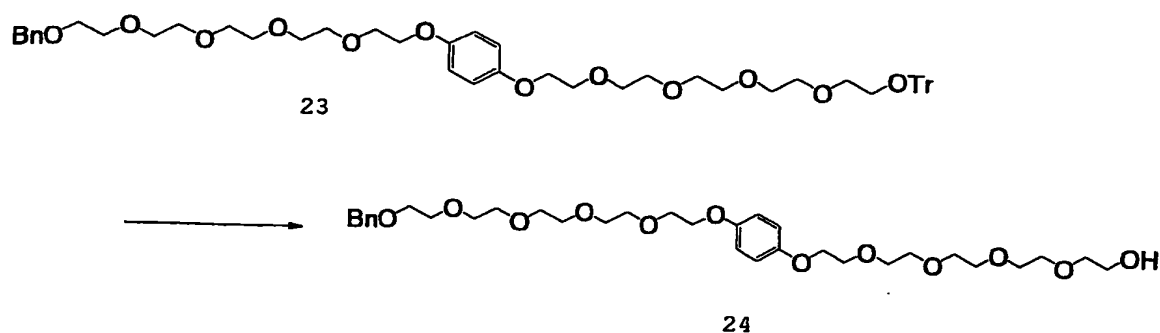
【0132】

製造例 35: 親水性スパーサー分子の合成(4-6)

1- [2- (2- {2- [2- (2-ベンジルオキシ—エトキシ) —エトキシ] —エトキシ} —エトキシ) —エトキシ] —4- [2- (2- {2- [2- (2-トリチルオキシ—エトキシ) —エトキシ] —エトキシ} —エトキシ) —エトキシ] ベンゼン (化合物 23) の合成

【0133】

【化36】



【0137】

氷冷した化合物23 (1.43 g, 1.62 mmol) の塩化メチレン (20 ml) 溶液へ、10%トリフルオロ酢酸を含む塩化メチレン溶液 (10 ml) を加え、さらにここへ水 (1 ml) を加えた後、氷浴を外し室温にて2時間30分間攪拌した。反応液を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液へ注ぎ反応を停止させた後、塩化メチレン、クロロホルムから抽出した。合わせた有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、ろ過減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YFLC Gel、溶出液 (10%メタノールを含む酢酸エチル)) に供し、化合物24 (淡黄色オイル 875 mg, 85%) を得た。

MS(m/z): 641 (MH⁺), ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.59-3.74 (32H, m), 3.80-3.84 (4H, m), 4.05-4.08 (4H, m), 4.56 (2H, s), 6.83 (4H, s), 7.26-7.34 (5H, m).

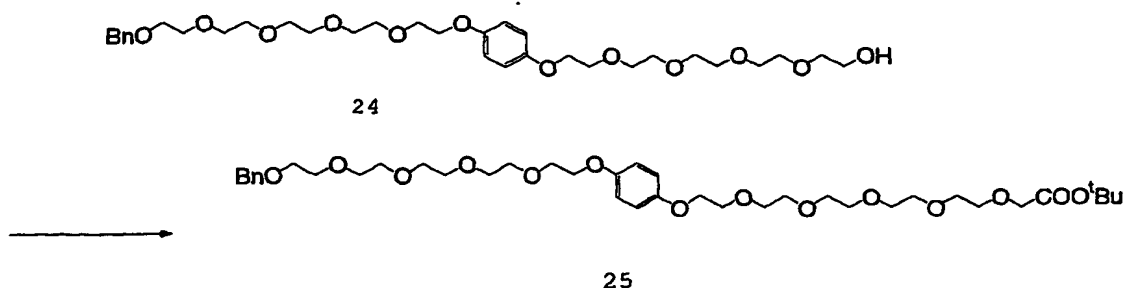
【0138】

製造例37: 親水性スパーサー分子の合成(4-8)

[2 - (2 - {2 - [2 - (2 - {4 - [2 - (2 - {2 - [2 - (2 - ベンジルオキシ - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ} - エトキシ) - エトキシ] - フェノキシ} - エトキシ) - エトキシ] - エトキシ} - エトキシ) - エトキシ] 酢酸 tert-ブチルエステル (化合物25) の合成

【0139】

【化 37】



【0140】

氷冷した水素化ナトリウム (180 mg, 4.5 mmol; 60% in mineral oil) の THF/DMF (5/1 混液 7 ml) 懸濁溶液へ、化合物 24 (817 mg, 1.28 mmol) の THF (6 ml) 溶液をゆっくりと加え、30 分間攪拌した。ここへブromo酢酸 tert-ブチルエステル (1.0 g, 5.1 mmol) の THF (7 ml) 溶液を加えた。氷浴を外した後、更に 2 時間室温にて攪拌した。注意深く水を加えて反応を停止させて後、酢酸エチルから抽出し、合わせた有機相を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過減圧濃縮後、得られた残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YF LC Gel、溶出液 (酢酸エチル ~ 5% メタノールを含む酢酸エチル溶液)) にて精製し、化合物 25 (淡黄色オイル 655 mg, 68%) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 1.47 (9H, s), 3.61-3.73 (30H, m), 3.81-3.84 (4H, m), 4.02 (2H, s), 4.05-4.08 (4H, m), 4.56 (2H, s), 6.83 (4H, s), 7.26-7.24 (5H, m).

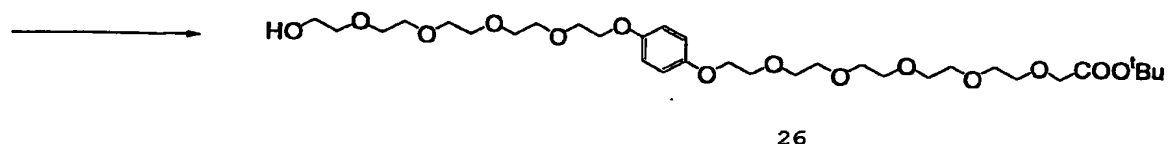
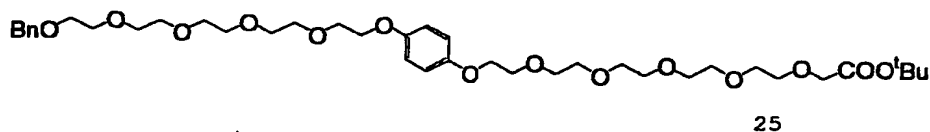
【0141】

製造例 38: 親水性スパーサー分子の合成 (4-9)

[2-(2-{2-[2-(2-{4-[2-(2-{2-[2-(2-ヒドロキシ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-フェノキシ]-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 tert-ブチルエステル (化合物 26) の合成

【0142】

【化38】



【0143】

窒素雰囲気下、水酸化パラジウム（20重量%；145mg）のメタノール（4ml）懸濁溶液へ化合物25（655mg，0.868mmol）のメタノール（6ml）溶液を加え、水素雰囲気に置換した後、室温で4時間攪拌した。再び窒素雰囲気とした後、酢酸エチル（約10ml）を加え、シリカゲル上でろ過し、10%メタノールを含む酢酸エチル溶液で洗浄した。減圧濃縮後、化合物26の粗精製物を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 1.47 (9H, s), 3.59–3.84 (36H, m), 3.81–3.84 (4H, m), 4.02 (2H, s), 4.07–4.09 (4H, m), 6.84 (4H, s).

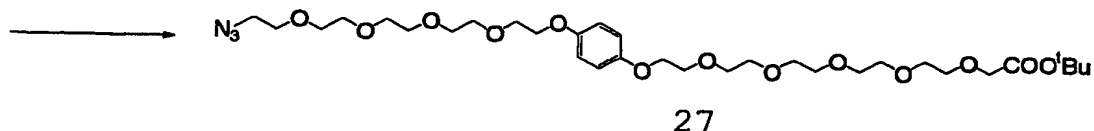
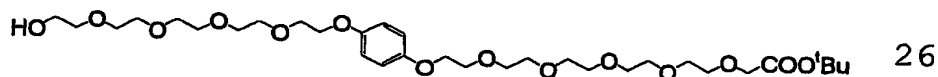
【0144】

製造例39：親水性スペーサー分子の合成(4-10)

[2-(2-{2-[2-(2-{4-[2-(2-{2-[2-(2-アジド-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-フェノキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-酢酸 tert-ブチルエステル（化合物27）の合成

【0145】

【化39】



【0146】

化合物 26 (254 mg, 0.451 mmol) のピリジン (1.5 mL) 溶液へ、4-ジメチルアミノピリジン (11 mg, 0.09 mmol) を加え氷冷した後、p-トルエンスルホニルクロライド (130 mg, 0.677 mmol) を加え、30℃～40℃に加温しつつ2時間攪拌した。ここへ氷を加えて反応を停止させた後、酢酸エチル、水を加えた。酢酸エチルから抽出し、合わせた有機相を飽和硫酸水素カリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過減圧下濃縮し、粗精製物を得た。得られた粗精製物を DMF (1 mL) に溶解し、ここへアジ化ナトリウム (264 mg, 4.1 mmol) を加えた。約60℃に加温し、90分間攪拌した。室温まで放冷した後、酢酸エチルで希釈した。更に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えた後、酢酸エチルから抽出した。合わせた有機相を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YFLC Gel、溶出液; 10%メタノールを含む酢酸エチル溶液) にて精製し、化合物 27 (無色オイル 196 mg, 73%、2 steps) を得た。

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3) \delta$: 1.47 (9H, s), 3.38 (2H, t, $J=5\text{Hz}$), 3.66-3.72 (30H, m), 3.81-3.84 (4H, m), 4.02 (2H, s), 4.06-4.08 (4H, m), 6.84 (4H, s).

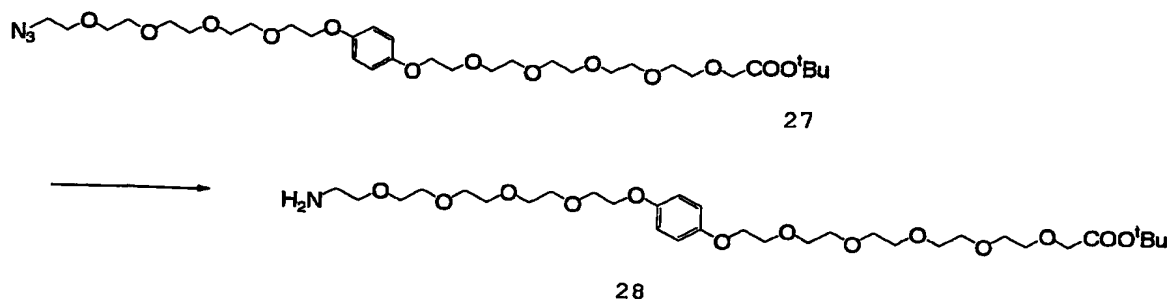
【0147】

製造例 40: 親水性スパーサー分子の合成(4-11)

[2-(2-{2-[2-(2-{4-[2-(2-{2-[2-(2-アミノ-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ]-フェノキシ]-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ}-エトキシ)-エトキシ] 酢酸 tert-ブチルエステル (化合物 28) の合成

【0148】

【化 40】



【0149】

窒素雰囲気下、水酸化パラジウム（20重量%；18mg）のメタノール（1 mL）懸濁溶液へ化合物 27（190mg，0.323mmol）のメタノール（1.5 mL）溶液を加え、水素雰囲気に置換した後、室温で1時間攪拌した。再び窒素雰囲気とした後、セライト上で不溶物をろ別し、メタノールで洗浄した。減圧下濃縮し化合物 28 の粗精製物を得た。

MS(m/z): 664 (MH⁺).

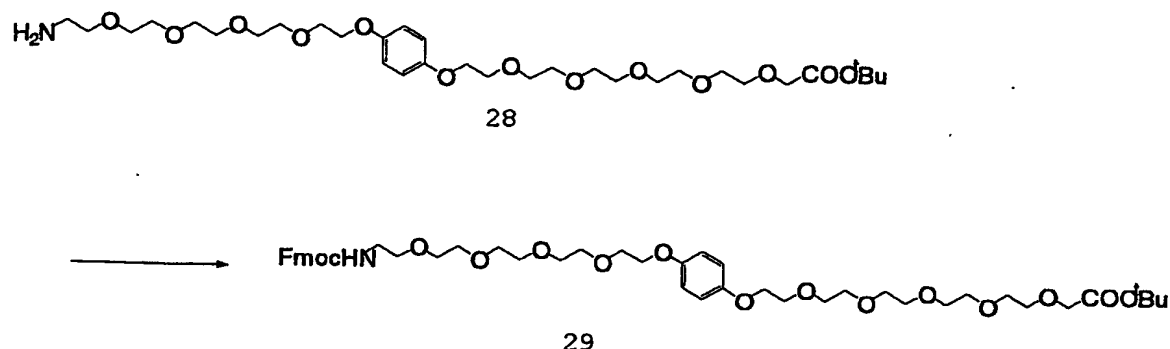
【0150】

製造例 41：親水性スパーサー分子の合成(4-12)

{2-[2-(2-{2-[2-(4-{2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-フェノキシ)-エトキシ]-エトキシ]-酢酸 tert-ブチルエステル (化合物 29) の合成

【0151】

【化 4 1】



【0152】

製造例 40 で得られた化合物 28 の粗精製物 (175 mg, 0.311 mmol) の THF (1.2 mL) 溶液を氷冷し、ここへ炭酸 9-フルオレニルメチルスクシンイミジル (115 mg, 0.34 mmol) の THF (0.5 mL) 溶液を加え、更にトリエチルアミン (62 mg, 0.62 mmol, 85 μ l) を加え 45 分間攪拌した。ここへ水を加えて反応を停止させた後、酢酸エチルから抽出し、合わせた有機相を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。ろ過減圧下濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YFLC Gel 1、溶出液; 酢酸エチル ~ 10% メタノールを含む酢酸エチル溶液) にて精製し、化合物 29 (無色オイル 196 mg, 84%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.47 (9H, s), 3.37-3.41 (1H, m), 3.55-3.84 (36H, m), 3.66-3.72 (30H, m), 4.01 (2H, s), 4.01-4.07 (4H, m), 4.20-4.23 (1H, m), 4.40 (2H, d, $J=7\text{Hz}$), 6.81 (4H, s), 7.29-7.33 (2H, m), 7.39-7.41 (2H, m), 7.60 (2H, d, $J=7\text{Hz}$), 7.76 (2H, d, $J=7\text{Hz}$).

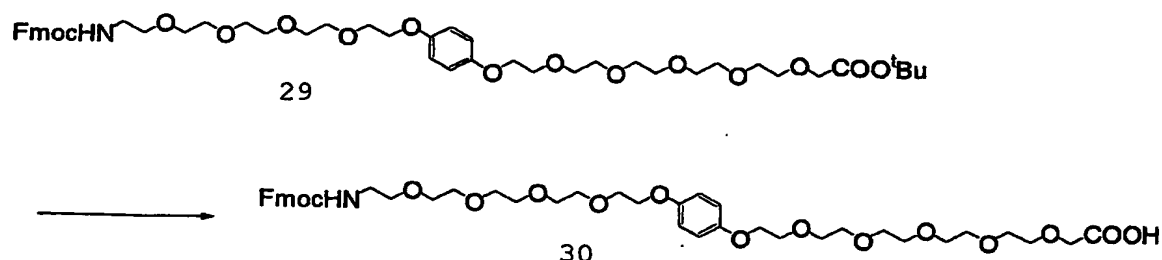
【0153】

製造例 42: 親水性スパーサー分子の合成 (4-13)

{2-[2-(2-{2-[2-(4-{2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ)-エトキシ]-エトキシ]-フェノキシ)-エトキシ]-エトキシ]-酢酸 (化合物 30) の合成

【0154】

【化 4 2】



【0155】

化合物 29 (196 mg, 0.25 mmol) へ 5% 含水トリフルオロ酢酸 (1.5 ml) を室温で加え、5 分間攪拌した。トルエン (約 1 ml) を加え、減圧濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (山善 YFLC Gel 1、溶出液; 3% メタノールを含むクロロホルム ~ 10% メタノールを含む酢酸エチル溶液) にて精製し、化合物 30 (無色オイル 175 mg, 96%) を得た。

MS(m/z): 830 (MH⁺), ¹H-NMR(CDCl₃) δ: 1.47 (9H, s), 3.37-3.39 (1H, m), 3.56-3.84 (36H, m), 4.02-4.07 (4H, m), 4.12 (2H, s), 4.22-4.23 (1H, m), 4.40 (2H, d, J=7Hz), 6.81 (4H, s), 7.29-7.33 (2H, m), 7.38-7.41 (2H, m), 7.60 (2H, d, J=7Hz), 7.76 (2H, d, J=7Hz).

【0156】

製造例 43: 親水性スパーサー付樹脂の合成: 化合物 30 誘導体付 TOYO パール樹脂 (TSK gel AF-amino) の合成

TOYO パール樹脂 (TSK gel AF-amino; 100 μl 中に 0.01 mmol のアミンが存在) に塩化メチレン (0.4 ml) と {2-[2-(2-{2-[2-(4-{2-[2-(2-{2-[2-(9H-フルオレン-9-イル-メトキシカルボニルアミノ)-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-エトキシ]-フェノキシ)-エトキシ]-エトキシ]-酢酸 (66 mg, 0.08 mmol) を加え、更にベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノーホスホニウム

ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 52 mg, 0.10 mmol)、及び N,N-ジイソプロピルエチルアミン (34 μl, 0.20 mmol) を加

え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及びDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合を確認した。得られた樹脂に無水酢酸/塩化メチレン/NMP (1/8/2) の混合溶液 (1.0 ml) を加えて室温で3時間振とうした。樹脂を塩化メチレン、及びDMFで十分に洗浄した後、ピペリジン/DMF/塩化メチレン (1/4/4) の混合溶液 (0.5 ml) を加えて室温で3時間振とうした。反応終了後、樹脂を塩化メチレン、及びDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストによりアミンの存在を確認し、親水性スパーサーが樹脂に付いたことが確認できた。

【0157】

製造例44：親水性スパーサー付樹脂の合成：化合物30誘導体ダイマー付TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) の合成

製造例43で得られた樹脂 (100 μ l) を製造例43の手法に従って反応し目的物を得た。これを製造例43の手法に従ってアセチル化、脱Fmoc化して、化合物30誘導体ダイマー付TOYOパール樹脂を得た。ニンヒドリンテストよりアミンの存在を確認し、親水性スパーサーが樹脂に付いたことが確認できた。

【0158】

製造例45：親水性スパーサー分子の合成(5-1)

2-[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] アミノ] -アセトアミド (化合物32) の合成

【0159】

【化43】



【0160】

2-アミノ-アセトアミド 塩酸塩 (化合物31, 10.0 g, 90.5 mmol) に、10%炭酸ナトリウム水溶液 (600 ml) 及びアセトン (250 ml) を加え、次いで氷冷下、N-(9-フルオレニルメトキシカルボニルオキシ

) スクシンイミド (30.5 mg, 90.5 mmol) のアセトン溶液 (250 ml) を滴下した。室温で1時間攪拌後、減圧濃縮して得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を2 Nクエン酸水溶液、炭酸水素ナトリウム水、飽和食塩水で順次洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、メタノールより結晶化を行い、目的とする2-[[(9H-フルオレン-9-イルメトキシ) カルボニル] アミノ] -アセトアミド (化合物32; 27.7 g, quant) を得た。

¹H-NMR(CDCl₃) δ: 3.87 (2H, bd), 4.23 (1H, t), 4.46 (2H, d), 7.30 (2H, t), 7.39 (2H, t), 7.57 (2H, d), 7.75 (2H, d); MS (m/z); 297.2 (M⁺).

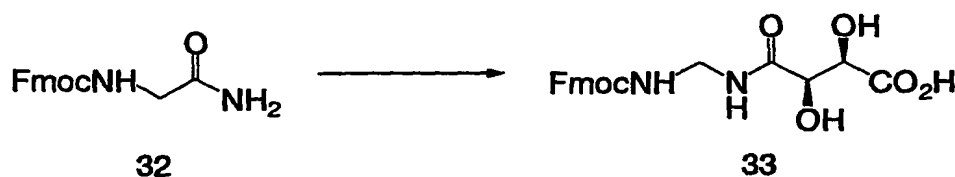
【0161】

製造例46: 親水性スパーサー分子の合成(5-2)

N-[(9H-フルオレン-9-イルメトキシカルボニルアミノ) -メチル] -2, 3-ジヒドロキシースクシンアミド酸(化合物33)の合成

【0162】

【化44】



【0163】

化合物32 (1.50 g, 5.06 mmol) に、酢酸エチル (15 ml)、アセトニトリル (15 ml)、H₂O (15 ml) 及び [ビス(トリフルオロアセトキシ) ヨード] ベンゼン (2.83 g, 6.58 mmol) を加え、室温で1.5時間攪拌した。0.2 N塩酸水溶液で逆抽出を行った後、得られた水相をジエチルエーテル:ヘキサン混合溶媒で洗浄した。氷冷下、飽和炭酸水素ナトリウム水にて水相をアルカリ性とした後、クロロホルムで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸マグネシウムで乾燥し、固形物をろ過、減圧濃縮した。得られた残渣に、L-(+)-酒石酸 (1.42 g, 9.45 mmol) 及びN, N-ジメチルホルムアミド (100 ml) を加え溶解させた。次いで、1

ーエチルー 3- (3-ジメチルーアミノプロピル)ーカルボジイミド 塩酸塩 (795 mg, 4.15 mmol) を加えた後、室温で終夜攪拌した。これを減圧濃縮して得られた残渣を酢酸エチルに溶解し、有機相を 2 N クエン酸水溶液で洗浄した。次いで、炭酸水素ナトリウム水を用いて逆抽出を行った後、得られた水相を酢酸エチルで洗浄した。氷冷下、2 N クエン酸水溶液にて水相を酸性とした後、酢酸エチルで抽出した。有機相を飽和食塩水で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。固形物をろ過、減圧濃縮した後、メタノールより結晶化を行い、目的とする N- [(9H-フルオレン-9-イルーメトキシカルボニルーアミノ)ーメチル]ー2, 3-ジヒドロキシースクシンアミド酸 (化合物 33; 588 mg, 29%) を得た。

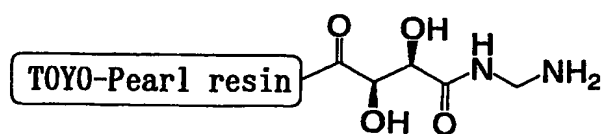
$^1\text{H-NMR}$ (d-acetone) δ : 4.24 (1H, t), 4.23 (2H, d), 4.44 (1H, d), 4.58-4.71 (3H, m), 7.33 (2H, t), 7.41 (2H, t), 7.71 (2H, d), 7.86 (2H, d);
MS (m/z); 401.2 (M^+).

【0164】

製造例 47: 親水性スパーサー付樹脂の合成: アミノメチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂の合成

【0165】

【化 45】



【0166】

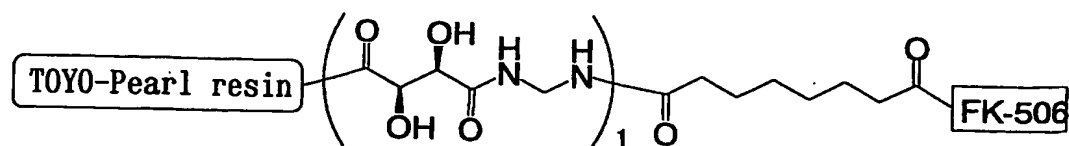
製造例 27 の手法に従って、TOYO パール樹脂 (TSK gel AF-amino; 100 μl 中に 0.01 mmol のアミンが存在) に化合物 33 を反応させ、アミノメチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO + (AMT)₁] を得た。

【0167】

製造例 48: FK506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂の合成
(TOYO + (AMT)₁-FK506)

【0168】

【化46】



【0169】

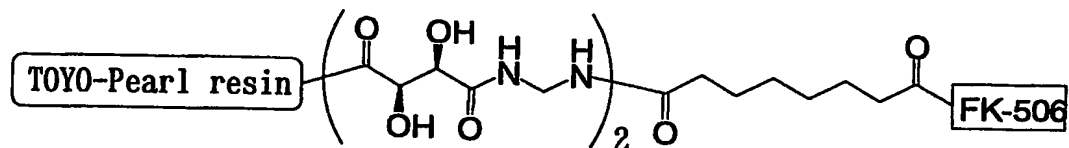
製造例 47 で得られたアミノメチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO + (AMT)₁] より、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スペーサーを有する FK506 結合型樹脂 [TOYO + (AMT)₁-FK506] を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スペーサー部分の HBA 数は 10、HBD 数は 7 である。

【0170】

製造例 49 : FK506 誘導体結合型親水性スペーサー付樹脂の合成
(TOYO + (AMT)₂-FK506)

【0171】

【化47】



【0172】

製造例 47 にて得られたアミノメチルタータリックジアミド誘導体付 TOYO パール樹脂 [TOYO + (AET)₁] より、製造例 47 に従い親水性スペーサーの伸長反応を行った。次いで、製造例 3 に述べた方法に準じ、親水性スペーサーを有する FK506 結合型樹脂 [TOYO + (AMT)₂-FK506] を合成した。TOYO パール樹脂と FK506 の間に介在する親水性スペーサー部分の HBA 数は 16、HBD 数は 11 である。

【0173】

実施例 1 : 結合実験

(1) l y s a t e の調製

ラットの脳 (2.2 g) を混合液 A (0.25 M シュクロース, 25 mM T r i s バッファー (pH 7.4), 22 ml) に混ぜ、ホモジネートを作成後、9500 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離上清を取り、50000 rpm でさらに 30 分間遠心分離した。こうして得られた上清を l y s a t e として使用した。なお、実験はすべて 4℃あるいは氷上で行った。

(2) 結合実験

上記した F K 506 を結合した各種アフィニティー樹脂を用いて以下の手順で l y s a t e との結合実験を行った。なお、l y s a t e は混合液 A で 1/2 に希釈して使用した。F K 506 を結合した各種アフィニティー樹脂それぞれ 10 μ l を使用した。

尚、F K 506 を結合した各種アフィニティー樹脂としては、ヘキサエチレングリコール誘導体の繰り返し構造の数をそれぞれ変えて調製した製造例 13 ~ 18 までの F K 506 誘導体結合型親水性スパーサー付樹脂を用いた。また、比較例として製造例 3 の F K 506 付 T O Y O パール樹脂を用いた。

F K 506 結合アフィニティー樹脂と l y s a t e (1 ml) を 4℃で終夜、静かに振とうした。その後、上清を除き、残った F K 506 結合アフィニティー樹脂を混合液 A で 4 回十分に洗浄して F K 506 結合アフィニティー樹脂表面を十分に洗浄した。

こうして得られた F K 506 結合アフィニティー樹脂に 20 μ l の S D S 用 l o a d i n g b u f f e r (nakalai cat.NO=30566-22、電気泳動用 sample buffer solution with 2-ME (2-mercaptoethanol) (2x) for SDS PAGE) を加え、25℃で 10 分間加熱した。こうして得られたサンプル液を市販の S D S ゲル (B i o R a d r e a d y G e l J, 15% S D S, cat. NO=161-J 341) で分離し、その S D S ゲルを解析した。比較例である製造例 3 の F K 506 付 T O Y O パール樹脂に結合 (吸着) した分子の内、代表的な 10 種類のバンドを選択し、そのピークの量を各製造例および比較例の樹脂について測定し、定量化した (図 1)。別に行ったウエスタンブロットによりバンド 10 が F K 5

06 のターゲット分子、FKBP12であることを確認した。

結果、親水性スパーサーを導入したものに非特異的な相互作用に基づくと思われるバンドの減少あるいは消失が認められた。これらの傾向は、ヘキサエチレングリコールの繰り返し構造の数が多くなるにつれて顕著であった。一方で、特異的相互作用に基づいてFK506結合アフィニティー樹脂に結合したFKBP12のバンド（バンド10）については親水性スパーサーの導入によるバンドの減少や消失は認められなかった。

同様な実験を他の親水性スパーサーについても行ったところ、バンドによって程度の違いはあったが非特異的な吸着を抑制することができた。

【0174】

実験例1：固相表面の疎水的性質と非特異的相互作用の相関性

CLOGPの異なる種々の化合物を固相表面に固定化することによって固相表面の疎水的性質を変え、非特異的相互作用との関係を調べた。使用した化合物を以下に示す。

【0175】

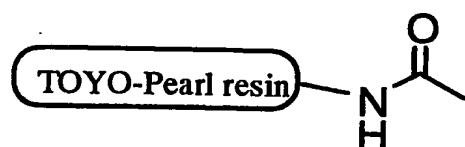
括弧内の数字はLOGP値を示している。

また、種々の化合物のTOYOパール樹脂への固定化は以下のようにして行った。

(1) 酢酸固定化樹脂〔TOYO+酢酸〕の合成

【0177】

【化49】



【0178】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) に酢酸を固定化した。

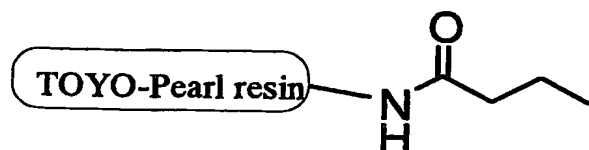
TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に 20% 無水酢酸-DMF 溶液を 0.5ml 加え、室温で 4 時間攪拌した。反応終了後、樹脂を DMF で十分に洗浄した。ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約 100%)。

【0179】

(2) 酪酸固定化樹脂〔TOYO+酪酸〕の合成

【0180】

【化50】



【0181】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) に酪酸を固定化した。

TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解した酪酸 ($3.40\mu\text{l}$, 0.04mmol)

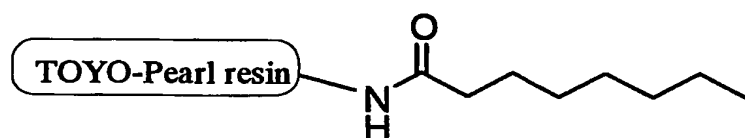
）を加え、更にベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート (PyBOP; 26 mg, 0.05 mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μ l, 0.10 mmol)を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約98%)。

【0182】

(3) オクタン酸固定化樹脂 [TOYO+オクタン酸] の合成

【0183】

【化51】



【0184】

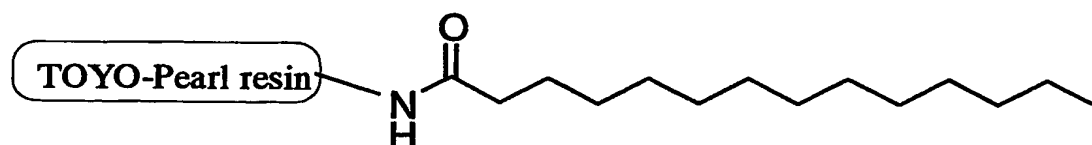
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にオクタン酸を固定化した。TOYOパール樹脂100 μ l相当に、DMF (0.25 ml) とジクロロメタン (0.25 ml) の混合溶媒に溶解したオクタン酸 (6.34 μ l, 0.04 mmol)を加え、PyBOP (26 mg, 0.05 mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μ l, 0.10 mmol)を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約97%)。

【0185】

(4) ミリスチン酸固定化樹脂 [TOYO+ミリスチン酸] の合成

【0186】

【化52】



【0187】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にミリスチン酸を固

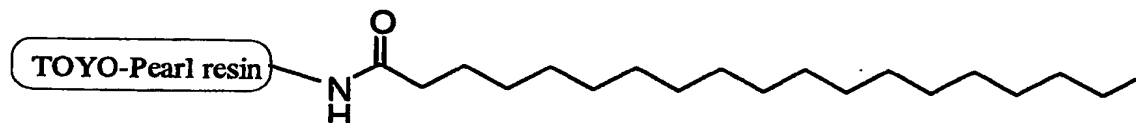
定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したミリスチン酸 (9.13mg , 0.04mmol) を加え、更に PyBOP (26mg , 0.05mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で 4 時間振とうした。反応終了後、樹脂を DMF で十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約 95%)。

【0188】

(5) ステアリン酸固定化樹脂 [TOYO+ステアリン酸] の合成

【0189】

【化53】



【0190】

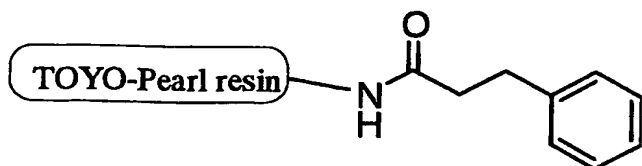
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にステアリン酸を固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したステアリン酸 (11.38mg , 0.04mmol) を加え、更に PyBOP (26mg , 0.05mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で 4 時間振とうした。反応終了後、樹脂を DMF で十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約 91%)。

【0191】

(6) フェニルプロピオン酸固定化樹脂 [TOYO+フェニルプロピオン酸] の合成

【0192】

【化54】



【0193】

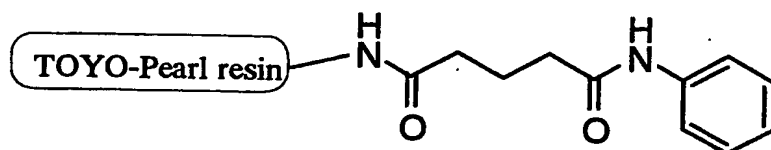
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にフェニルプロピオン酸を固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したフェニルプロピオン酸 (6.0mg , 0.04mmol) を加え、更に PyBOP (26mg , 0.05mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約97%)。

【0194】

(7) グルタラニリッ酸固定化樹脂 [TOYO+グルタラニリッ酸] の合成

【0195】

【化55】



【0196】

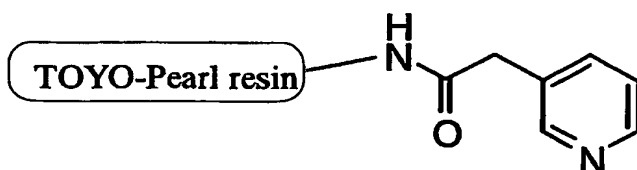
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にグルタラニリッ酸を固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したグルタラニリッ酸 (8.3mg , 0.04mmol) を加え、更に PyBOP (26mg , 0.05mmol)、及び N, N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約97%)。

【0197】

(8) 3-ピリジル酢酸固定化樹脂〔TOYO+3-ピリジル酢酸〕の合成

【0198】

【化56】



【0199】

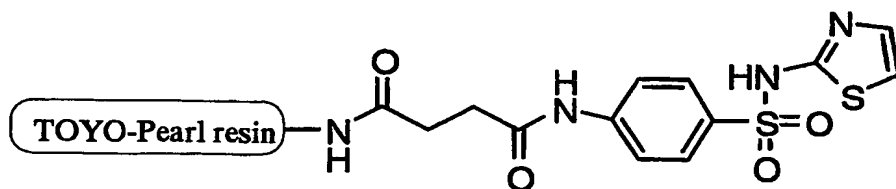
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) に3-ピリジル酢酸を固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解した3-ピリジル酢酸 (6.9mg , 0.04mmol) を加え、更にPyBOP (26mg , 0.05mmol)、及びN,N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約96%)。

【0200】

(9) サクシニルサルファチアゾール固定化樹脂〔TOYO+サクシニルサルファチアゾール〕の合成

【0201】

【化57】



【0202】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にサクシニルサルファチアゾールを固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したサクシニルサルファチアゾール (14.2mg , 0.04mmol) を加え、更にPyBOP

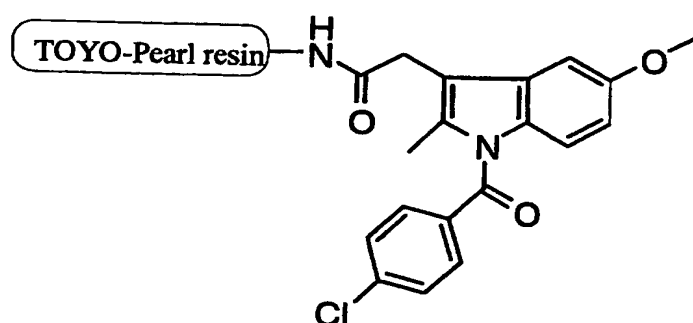
(26 mg, 0.05 mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μ l, 0.10 mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約75%)。

【0203】

(10) インドメタシン固定化樹脂 [TOYO+インドメタシン] の合成

【0204】

【化58】



【0205】

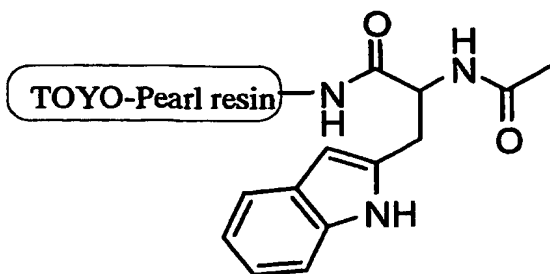
TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にインドメタシンを固定化した。TOYOパール樹脂100 μ lに、DMF (0.25 ml) とジクロロメタン (0.25 ml) の混合溶媒に溶解したインドメタシン (14.3 mg, 0.04 mmol) を加え、更にPyBOP (26 mg, 0.05 mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン (17 μ l, 0.10 mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約93%)。

【0206】

(11) N-アセチルトリプトファン固定化樹脂 [TOYO+N-アセチルトリプトファン] の合成

【0207】

【化59】



【0208】

TOYOパール樹脂 (TSK gel AF-amino) にN-アセチルトリプトファンを固定化した。TOYOパール樹脂 $100\mu\text{l}$ に、DMF (0.25ml) とジクロロメタン (0.25ml) の混合溶媒に溶解したN-アセチルトリプトファン (9.9mg , 0.04mmol) を加え、更にPyBOP (26mg , 0.05mmol)、及びN, N-ジイソプロピルエチルアミン ($17\mu\text{l}$, 0.10mmol) を加え、室温で4時間振とうした。反応終了後、樹脂をDMFで十分に洗浄した後、ニンヒドリンテストにより縮合収率を測定した (約90%)。

【0209】

尚、FK506固定化樹脂 [TOYO+FK506] は製造例3で調製したものをを用いた。

【0210】

それぞれの化合物付TOYOパール樹脂を用いてlysateとの結合実験を行った。lysateは実施例1(1)で調製したものをを用いた。

結合実験についても、固相担体を、各種化合物が固定化されたTOYOパール樹脂を用いること以外は実施例1(2)に準じて行った。

非特異的な相互作用による非特異的な吸着に基づくと思われるバンドを6種類選択し、そのピークの量を各化合物付樹脂について測定し、定量化した。各化合物の疎水性パラメーターとしてCLOGPを用い、非特異的な結合に基づくバンドのピーク量との関係を調べ、定量化した (図2)。CLOGPが大きくなるにつれ非特異的結合が増した。この結果は固相表面の疎水的な性質が強まるにつれ

、非特異的な相互作用による吸着が増加することを示している。

【0211】

【発明の効果】

疎水的な性質を有する固相表面と検討対象のリガンドとの結合に親水性のスペーサーを導入することにより、非特異的な相互作用を抑制することが出来る。親水性スペーサーの導入は僅かな導入でも効果がある。また、この効果は親水性スペーサーの導入の量に比例して増大させることが出来る。

低分子-低分子、低分子-高分子、高分子-高分子の相互作用を、片方の分子を固相担体に固定し、相互作用を測定、あるいは相互作用をベースとして目的とするターゲットを精製する研究において、本願発明の技術により非特異的な相互作用を人為的に抑制することが可能である。すなわち、本技術は低分子-高分子、低分子-低分子、高分子-高分子相互作用を片方の分子を固相担体に固定し、相互作用を測定、あるいは相互作用をベースとして目的とするターゲットを精製する研究を容易にするものである。これらの成果は生命科学全般、特に創薬研究、ポストゲノム研究、プロテオミクス、ケミカルジェノミクス、ケミカルプロテオミクス等に広く応用できるものである。

【図面の簡単な説明】

【図1】

親水性スペーサーを導入することによる、固相担体上での非特異分子間相互作用の抑制効果を示すグラフである。固相担体および／または固相担体上のFK506に吸着する分子のうち10種を選択し、それぞれの吸着量に及ぼす親水性スペーサーの導入の影響を示す。FK506に特異的な相互作用を示すFKBP12の吸着量は、親水性スペーサーの導入およびヘキサエチレングリコールの繰り返し構造の数に関わらずほぼ一定であったが、特にバンド1や2の吸着量は顕著に減少し、これらのバンドが非特異的な相互作用によりFK506結合アフィニティー樹脂に結合していたこと、および親水性スペーサーの導入によりこの非特異的な相互作用を抑制することができたことを示している。横軸はSDS-PAGEのレーンの番号を、縦軸はSDS-PAGEにおけるバンドのピーク量を相対的に表したものである。

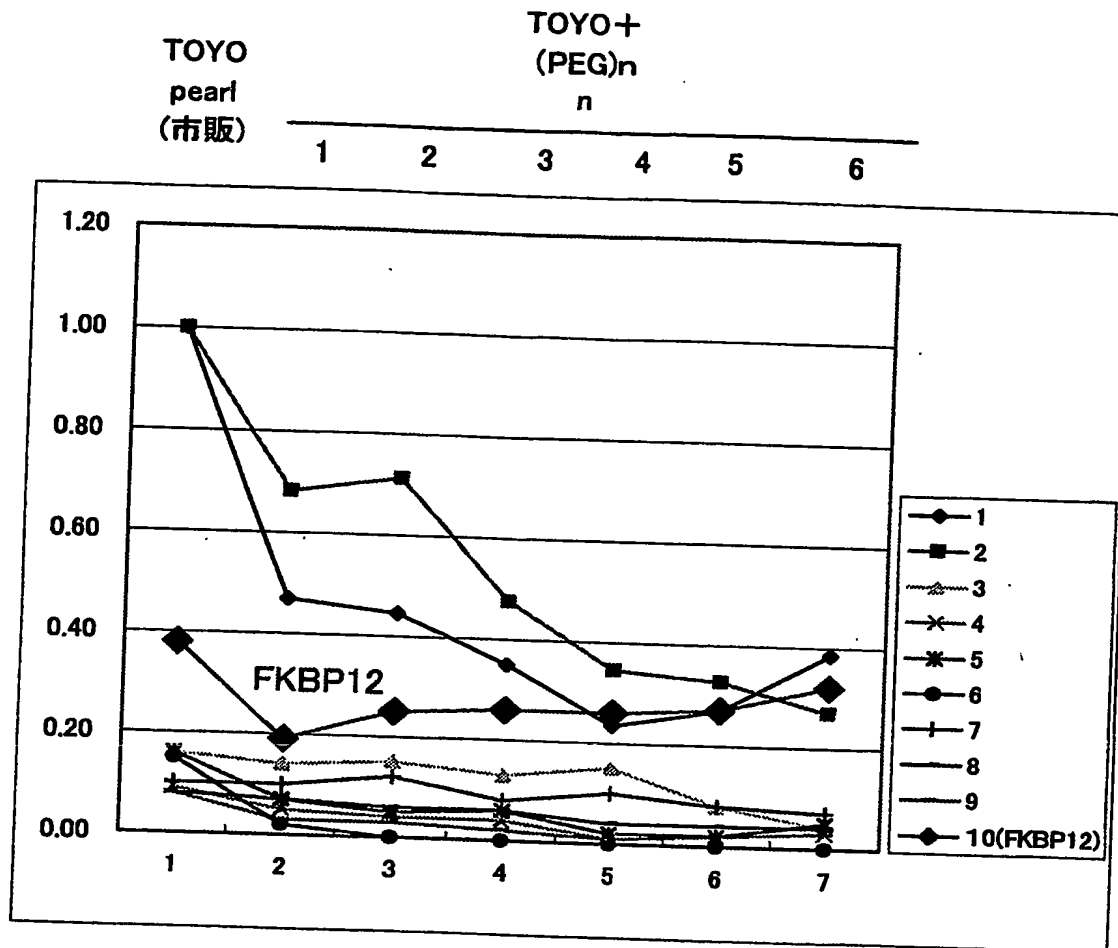
【図 2】

固相表面の疎水性と非特異的相互作用との関係を示したグラフである。縦軸は非特異的な結合に基づくと思われる 6 種類のタンパク質の固相表面への結合量を、SDS-PAGE におけるバンドのピーク量をもとに相対的に表したものである。横軸は疎水性パラメーターである CLOGP の値を示す。

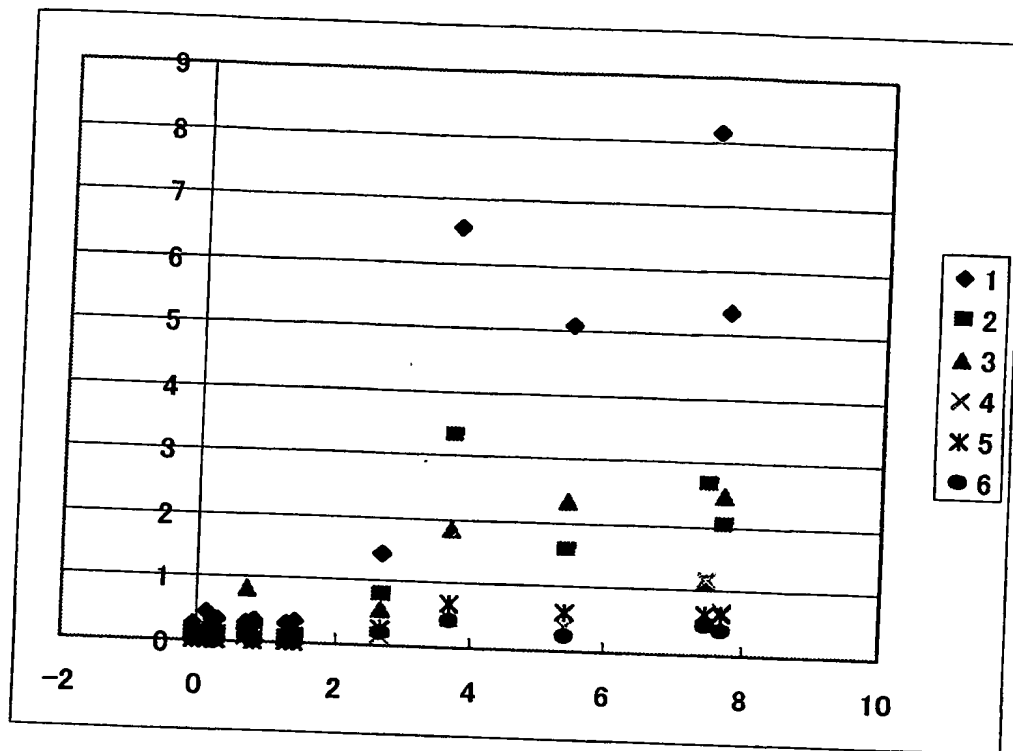
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【解決手段】 分子を固相担体に固定化し、当該固相上で該分子と特異的に相互作用する分子との間での特異相互作用を解析する過程において、固相担体における固相表面の疎水的性質を調節すること、特に固相担体への分子の固定化の際に親水性スパーサーを介在させることを特徴とする、分子間の非特異相互作用を抑制する方法。

【効果】 固相表面の疎水的性質を調節、特に親水性スパーサーの介在により調節することによって、分子間の非特異的相互作用を抑制することが可能となり、固相上への非特異的な吸着を低減化することができる。

【選択図】 なし

特願 2002-222226

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501260082]

1. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

2001年 6月28日

新規登録

千葉県木更津市矢那1532番地3

株式会社リバース・プロテオミクス研究所

2. 変更年月日
[変更理由]

住 所
氏 名

2002年12月13日

住所変更

千葉県木更津市かずさ鎌足2丁目6番地7

株式会社リバース・プロテオミクス研究所

特願2002-222226

出願人履歴情報

識別番号

[000005245]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1990年 8月17日
新規登録
大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号
藤沢薬品工業株式会社